

Aus dem Medizinischen Zentrum für
Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. J. A. Werner
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

**Sequenzanalyse des Epidermal Growth Factor Receptors bei
Plattenepithel-Karzinom-Zelllinien des Kopf-Hals-Bereiches und
ihre potentielle Bedeutung für die Pathogenese**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Vanessa Krohn

aus Marburg

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 04.02.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. R. Mandic

Korreferent: Prof. Dr. T. Stiewe

Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krebsmortalität	1
1.2	Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich.....	1
1.3	Der EGF-Rezeptor	2
1.4	Die Rolle von EGFR bei der Tumorentstehung.....	4
1.5	Inhibitoren der EGFR-vermittelten Tumorentstehung	5
1.6	Zielsetzung.....	5
2	Material.....	7
2.1	Chemikalien	7
2.2	Medien.....	9
2.3	Puffer, Lösungen und Reaktionsansätze.....	9
2.4	Antikörper.....	14
2.5	Kits	14
2.6	Oligonukleotid-Primer.....	15
2.7	Zelllinien.....	16
2.8	Restriktionsenzyme und Puffer	16
2.9	Geräte	17
2.10	Software	17
3	Methoden	18
3.1	Zellkultur	18
3.2	RT-PCR, Subklonierung und Sequenzierung	19
3.3	Analyse von Proteinen.....	27
3.4	Immunzytochemie unstimulierter Zellen	30
3.5	Immunzytochemie stimulierter Zellen	30

3.6	FACS-Analyse	31
3.7	Invasions-Assay	32
4	Ergebnisse	34
4.1	EGFR-Mutationsstatus in HNSCC-Zelllinien	34
4.2	Zellzyklus- und Western Blot-Untersuchungen bei den EGFR-Varianten	35
4.2.1	Einfluss einer TGF- α -Stimulation	35
4.2.2	Einfluss von AG1478.....	40
4.2.3	Einfluss von Cetuximab	44
4.2.4	Einfluss von AG1478 bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF- α	48
4.2.5	Einfluss von Cetuximab bei TGF- α -Stimulation	50
4.3	Immunzytochemische Darstellung von EGFR in den untersuchten HNSCC-Zelllinien.....	52
4.4	Auswirkungen von TGF- α auf die Aktin-Expression	58
4.5	Invasions-Assay	58
5	Diskussion	60
5.1	EGFR-Sequenzanalyse in HNSCC-Zelllinien	61
5.2	Zellzyklus- und Western Blot-Untersuchung von HNSCC-Zelllinien nach EGFR-Stimulation und Inhibition.....	62
5.2.1	TGF- α	62
5.2.2	AG1478.....	64
5.2.3	Cetuximab	66
5.2.4	Inkubation der Zelllinien mit Inhibitoren bei Liganden-Stimulation	67
5.3	Immunzytochemische Darstellung von EGFR in den untersuchten HNSCC-Zelllinien.....	68
5.4	Immunzytochemische Untersuchung beider EGFR-Varianten auf Unterschiede in der TGF- α -Expression.....	69

5.5	Induktion der Aktin-Expression nach TGF- α -Stimulation.....	70
5.6	Invasions-Assay	71
6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis	74
8	Anhang.....	81
8.1	Abkürzungen.....	81
8.2	Histogramme der FACS-Analyse	83
8.3	Abbilungsverzeichnis	87
8.4	Tabellenverzeichnis.....	88
8.5	Publikationen	88
8.6	Tabellarischer Lebenslauf.....	89
8.7	Verzeichnis der akademischen Lehrer	90
8.8	Danksagung	91
8.9	Ehrenwörtliche Erklärung.....	92

1 Einleitung

1.1 Krebsmortalität

Krebs ist nach den Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Pro Jahr erkranken in Deutschland etwa 450.000 Menschen an Tumoren, rund 270.000 versterben daran (RKI, 2008). Krebs gehört daher zu einer der am meisten gefürchtetsten Erkrankungen.

Die Sterblichkeit bedingt durch Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems konnte in den letzten Jahren durch verbesserte diagnostische und therapeutische Maßnahmen deutlich reduziert werden (RKI, 2007). Die Sterblichkeit durch Tumorerkrankungen geht hingegen nur langsam zurück. Die Zahl neuer Tumorerkrankungsfälle wird in den nächsten Jahrzehnten zudem weiter steigen. So ist damit zu rechnen, dass in einigen Jahren Krebs zur häufigsten Todesursache in Deutschland werden wird. 2008 veröffentlichte die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut aktuelle Schätzungen, nach denen Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs mit einem Anteil von 3,3% an allen Krebsneuerkrankungen bei den Männern den siebten Rang der häufigsten Tumorerkrankung in Deutschland einnehmen. Bei Frauen befanden sich diese hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit an fünfzehnter Stelle.

1.2 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

Krebserkrankungen der oberen Luft- und Speisewege beinhalten bösartige Neubildungen der Mundhöhle, des Rachens (Oro-, Hypo- und Nasopharynx), des Kehlkopfes, der Speicheldrüsen, der Nasenhaupt- und -nebenhöhlen. Mit einem histologischen Anteil von 90% stellen die Plattenepithelkarzinome (in international gängiger Schrift *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*, kurz HNSCC) den Großteil der malignen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches dar. Plattenepithelkarzinome liegen bereits jetzt weltweit an sechster Stelle der häufigsten Tumorerkrankung. Sie sind eine der Hauptursachen, sowohl für Krebsmorbidity, als auch Krebsmortalität. Die Prävalenz dieser Karzinome ist von deutlich steigender Tendenz. Überdies hat sich die

Mortalität in den letzten 20 Jahren verdreifacht. Männer erkranken deutlich häufiger als Frauen. Immer häufiger sind auch jüngere Patienten betroffen. Als Hauptrisikofaktoren gelten chronischer Tabak- und Alkoholkonsum. Sie sind bei den meisten Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich anzutreffen. Raucher erkranken an diesen bösartigen Neubildungen bis zu sechsmal häufiger als Nichtraucher. Eine Kombination von Alkoholkonsum und Rauchen verstärkt das Risiko zusätzlich.

Eine frühe Diagnose des Tumorleidens erweist sich sowohl auf Grund weniger, spezifischer Symptome im Frühstadium, als auch durch ein begrenztes Verständnis der Ätiologie und Onkogenese als besonders schwierig. Trotz Fortschritten in Diagnostik und Therapie lässt sich die Fünf-Jahres-Überlebensrate der erkrankten Patienten nur geringfügig verbessern. Denn tragischer Weise werden HNSCC-Tumore bei zwei Dritteln der Patienten erst diagnostiziert, wenn sich die Tumoren in einem schon lokal fortgeschrittenen oder bereits metastasierten Stadium befinden. Als Metastase wird eine Tochtergeschwulst eines Malignoms bezeichnet. Hierbei verlassen Krebszellen ihren Entstehungsort auf dem Blut- oder Lymphweg und siedeln sich in Geweben ab, die weit entfernt vom ursprünglichen Krankheitsprozess liegen. Dort vermehren sie sich und bilden sogenannte Metastasen. Diese Ausbreitung der Erkrankung auf weitere Organe oder gar den gesamten Körper ist eine typische Eigenschaft von Malignomen, besonders auch der Karzinome im Kopf-Hals-Bereich. Eine frühe lymphogene Metastasierung mit darauf folgenden Lymphknoten- und Fernmetastasen ist für diese Krebserkrankung dabei besonders charakteristisch [44]. Ein enger Zusammenhang zwischen einem Lymphknotenbefall und dem Auftreten von Fernmetastasen wurde bereits häufig beschrieben. Daher gelten Lymphknotenmetastasen als wichtiger Marker für die Prognose bei Tumorpatienten mit Kopf-Hals-Karzinomen.

Vor diesem Hintergrund stellen die Fortentwicklung präventiver Maßnahmen, der Krebsfrüherkennung sowie neuer Therapiestrategien wichtige Ziele der Forschung dar.

1.3 Der EGF-Rezeptor

Die Rezeptor-Thyrosin-Kinase EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) ist ein membrangebundenes Glykoprotein von 170 kDa und gehört zur Familie der Erb-Rezeptoren. Wie alle Mitglieder dieser Familie besteht er aus einer extrazellulären,

einer transmembranären und einer zytoplasmatischen Domäne. Letztere besitzt Tyrosin-Kinase-Aktivität (Abbildung 1.1).

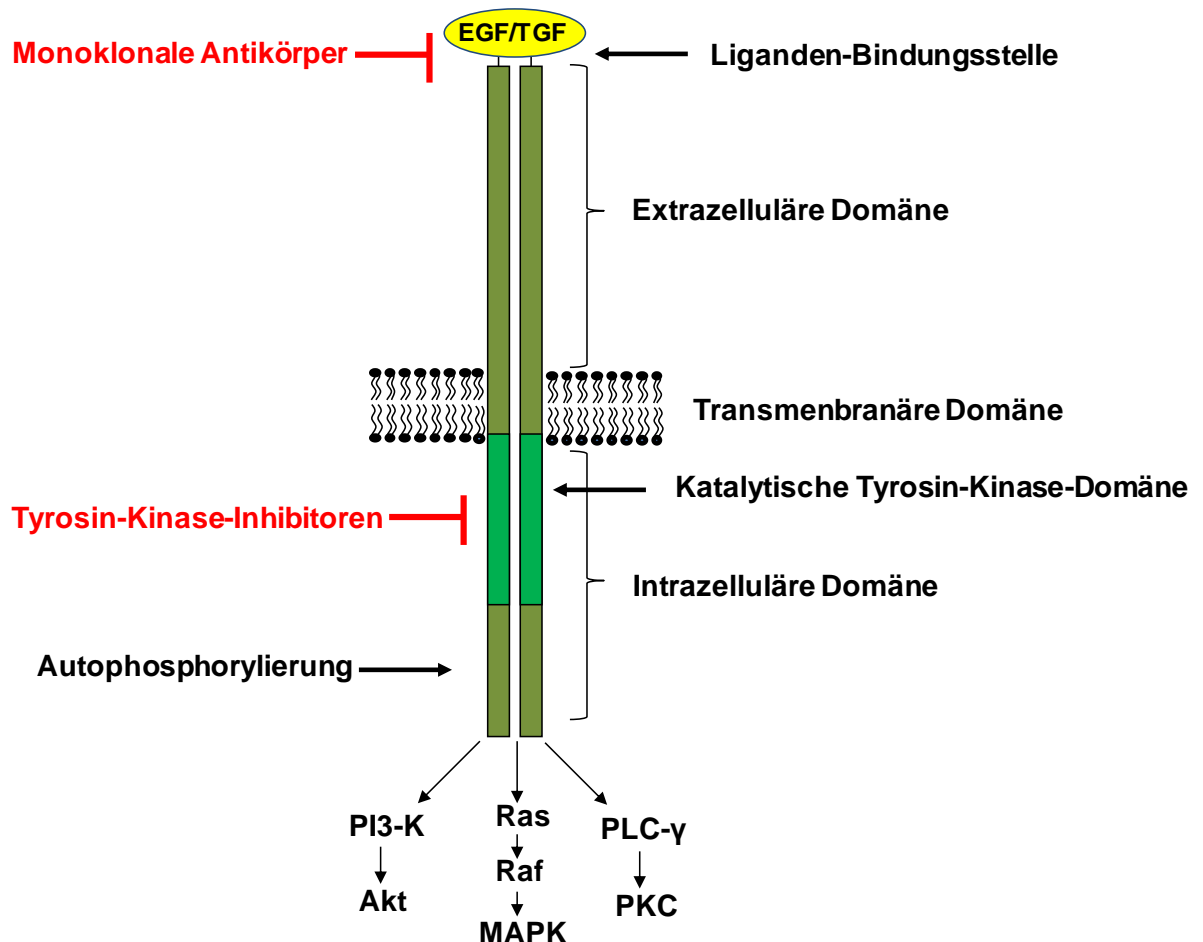


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des EGF-Rezeptor mit seiner Signalvermittlung. Die Angriffspunkte der verschiedenen Inhibitor-Klassen sind in rot dargestellt.

Der EGFR ist ein Rezeptor für Wachstumsfaktoren, der sich auf der Zelloberfläche vieler Epithelzelltypen befindet. Zu den wichtigsten Liganden dieses Rezeptors zählen vor allem die Wachstumsfaktoren *Epidermal Growth Factor* (EGF) und *Transforming Growth Factor-alpha* (TGF- α).

Im inaktiven Zustand liegt EGFR als Monomer auf der Zelloberfläche vor. Bindet ein Ligand an der Membran, so kommt es zu einer Dimerisierung von Rezeptor-Monomeren [33]. Dieser Vorgang führt zu einer Autophosphorylierung intrazellulärer

Tyrosin-Reste des Rezeptors. Tyrosin dient hierbei als Bindungsstelle für zahlreiche Adapter- und Signalmoleküle. Die Phosphorylierung dieser Tyrosin-Reste bildet den Startpunkt für zelluläre Signalkaskaden, die Signale in das Innere der Zelle fortleiten. Zu den wichtigsten Signalkaskaden des EGFRs gehören die Ras/MAPK (*mitogen activated protein kinase*)- und die STAT (*signal transducer and activator of transcription*)- Kaskade [33].

Die Aktivierung dieser Signalwege führt in gesundem Gewebe über die Transkription EGFR-abhängiger Gene zu einer Stimulation des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und zu einer Verminderung des programmierten Zelltodes. Eine Dysregulation der Rezeptoraktivität steht in engem Zusammenhang mit einer Tumorentstehung [7, 42].

Die Inaktivierung des Rezeptors wird über eigenen Abbau vermittelt. Dabei bewirkt die Bindung eines Liganden an den Rezeptor eine sofortige Aufnahme des Liganden-Rezeptor-Komplexes innerhalb Clathrin-besetzter Vesikel ins Innere der Zelle. Hier erfolgt eine Sortierung der Rezeptoren, durch die ein Teil der Rezeptoren auf die Oberfläche der Zellen zurück transportiert wird. Die übrigen Rezeptoren werden in Lysosomen der Zellen überführt und dort degradiert.

1.4 Die Rolle von EGFR bei der Tumorentstehung

Der EGF-Rezeptor ist häufig überexprimiert in Tumoren der Brust, der Lunge und des Dickdarms. HNSCC-Tumoren überexprimieren den EGFR in bis zu 100% der Fälle. Dies scheint ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung zu sein. In einigen Tumoren konnte ein Zusammenhang zwischen einer EGFR-Überexpression mit einer ungünstigeren Prognose sowie einem erhöhten Metastasierungsrisiko nachgewiesen werden [8].

Außerdem wird in HNSCC-Tumoren nicht selten eine gleichzeitige Expression des EGFR-Liganden TGF- α beobachtet [15]. Es wird vermutet, dass diese autokrine Expression des Liganden zu einer dauerhaften Aktivierung des EGF-Rezeptors und einem rascheren Krankheitsprogress von HNSCC-Tumoren führt. Aus diesen Gründen stellt der EGFR ein zentrales therapeutisches Ziel in der Behandlung von EGFR-

exprimierenden Tumoren, insbesondere auch von Tumoren der oberen Luft- und Speisewege dar.

1.5 Inhibitoren der EGFR-vermittelten Tumorentstehung

Seit der Entdeckung des EGFR und der Entschlüsselung der EGFR-Signalkaskaden in den 1980er Jahren spielt dieser eine zentrale Rolle in der Anti-Krebs-Therapie. Der EGFR wurde bereits in zahlreichen früheren Studien im Hinblick auf zelluläre Mechanismen untersucht, die einer Steigerung der Rezeptoraktivität zu Grunde liegen und einen Angriffspunkt für Anti-EGFR-Wirkstoffe darstellen könnten. Die Strategien der Krebstherapie verfolgen das Ziel, die EGFR-Signalvermittlung zu unterbrechen. Zwei komplementäre therapeutische Strategien für HNSCC-Tumore haben sich in den letzten Jahren etabliert (siehe auch Abbildung 1.1).

Zum einen zeigt die Therapie mit monoklonalen Antikörpern, welche die Liganden-Bindungsstelle des Rezeptors kompetitiv blockieren, einen wachstumshemmenden Effekt. Dabei besitzt der am weitesten entwickelte Repräsentant der Antikörpertherapie, Cetuximab, eine zehnfach höhere Affinität für den EGFR als seine natürlichen Liganden [15]. Gleichzeitig kommt es zu einer Internalisierung und Degradation des Antikörper-Rezeptor-Komplexes, was zu einem Rückgang von Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt [9].

Andererseits werden Tyrosin-Kinase-Inhibitoren verwendet, die durch die kompetitive Blockade der ATP-Bindungsstelle der Rezeptor-Tyrosin-Kinase eine Autophosphorylierung der katalytischen Domäne des EGFRs verhindern. Sie führen dadurch zu einer Blockade der Signalvermittlung und zur Apoptose [36].

1.6 Zielsetzung

Es ist interessant zu beobachten, dass HNSCC-Tumorzellen deutliche Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber Inhibitoren aufweisen [22]. Die Mechanismen, die einer Sensitivität oder gar einer Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren unterliegen, sind noch unklar. Daher sind Untersuchungen notwendig, die den Einfluss der EGFR-Signalvermittlung auf den Erfolg verschiedener Therapiemethoden bei HNSCC-

Tumoren analysieren. Frühere Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit der Frage, in wie fern die EGFR-Aktivierung die Sensitivität von HNSCC-Tumorzellen gegenüber Inhibitoren beeinflusst. Da eine EGFR-Überexpression in HNSCC-Tumoren eine zentrale Bedeutung hat, widmete sich die vorliegende Arbeit der Frage, welche EGFR-assoziierten Faktoren die Sensitivität einer anti-EGFR-Tumorthérapie von HNSCC-Tumoren beeinflussen können.

Hierzu sollten insbesondere Unterschiede in der Proteinsequenz des EGFR berücksichtigt werden, da zuvor bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (*Non-small cell lung cancer*, NSCLC) gezeigt werden konnte, dass Mutationen im Bereich der intrazellulären Kinasedomäne des Rezeptors zu einer dramatischen Änderung des Ansprechens von EGFR-Kinase-Inhibitoren führte.

2 Material

2.1 Chemikalien

- AG1478 (CALBIOCHEM, San Diego, CA,USA)
- Agar, Select (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Agarose (Electrophoresis grade) (Invitrogen Life Technologies, Scotland,UK)
- Ammonium persulfate (APS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ampli Taq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- Ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- BSA (PAA Laboratories, Pasching, Austria)
- Cetuximab Infusionslösung (Erbix, Merck, Darmstadt)
- DAPI (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)
- DMEM (PAA Laboratories, Pasching, Austria)
- DNA HAE III Digest (DNA Marker) (New England Bio Labs, Beverly, MA, USA)
- DNA Hind III Digest (DNA Marker) (New England Bio Labs, Beverly, MA, USA)
- dTTP PCR Grade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline PBS (Biochrom AG, Berlin)
- Dodecylsulfat (Serva Electrophoresis, Heidelberg)
- EDTA (Roth, Karlsruhe)
- Essigsäure 100% (Merck, Darmstadt)
- Ethanol (Roth, Karlsruhe)
- Ethidiumbromid 1% (Roth, Karlsruhe)
- Fluorescent Mounting Media (Dako Cytomation , Carpinteria, Foster City, CA, USA)
- Glycerin (Roth, Karlsruhe)
- Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- HCL (Merck, Darmstadt)

- Isopropanol (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Isopropyl- β -D-Thiogalacto-Pyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Magermilchpulver (Merck, Darmstadt)
- 2-Mercapto-Ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydroxid (Fisher Scientific, Leicestershire, UK)
- Nonidet P40 Substitute NP40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Penicillin-Streptomycin-Gemisch (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)
- Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
- Precision Plus Protein All Blue Standards (BioRad Laboratories, München)
- Propidium Jodid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BioRad Laboratories, München)
- Medizinische Röntgenfilme (Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgium)
- RED Taq Mix Ready Mix PCR Reaction Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ribonuclease A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe)
- TEMED (Roth, Karlsruhe)
- TGF- α , rekombinant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SA)
- Tris-Hydrochloric Acid (Roth, Karlsruhe)
- Trypsin-EDTA (PAA, Laboratories, Pasching, Austria)
- Tryptone EZMix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween-20 (Roth, Karlsruhe)
- X-Gal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Yeast Extract EZMix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.2 Medien

- DMEM Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin, Gentamicin und Amphotericin
- L-Broth Medium (pH 7,0) auf 1 l Aqua dest.:

NaCl	5 g
Yeast	5 g
Tryptone	10 g
für Agar-Platten Agar-Agar	15 g

2.3 Puffer, Lösungen und Reaktionsansätze

(Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Protokolle der Hersteller bzw. gängige Laborprotokolle)

cDNA-Synthese mit First Strand cDNA-Synthesis Kit (Roche)

- Reverse Transkriptase-Ansatz:

RNA	1 µg
Oligo(dT) ₁₈ -Primer (0,8 µg/µl)	1 µl
10x Puffer	4 µl
Desoxynucleotid-Mix (10 mM)	2 µl
RNase Inhibitor (50 U/µl)	0,5 µl
Reverse Transkriptase (20 U/µl)	1 µl
H ₂ O	auf 12,5 µl finales Volumen

PCR

- 5x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) für Agarose-Gelelektrophorese (auf 1l Aqua dest.):

Tris-Base	24,2 g
Eisessig	5,7 ml
EDTA	3,7 g

- DNA- Ladepuffer (6x Probenpuffer für Agarose- Gelelektrophorese):

Glycerin	5 ml
Bromphenolblau	40 mg
Xylencyanol	40 mg
EDTA	3,7 mg

- PCR-Ansatz:

Red Taq Mix	12,5 µl
5`Primer (1 mM)	0,5 µl
3`Primer (1 mM)	0,5 µl
Template (1 µg/µl)	1 µl
Aqua dest.	10,5 µl

- Agarose Gel 0,8%:

Agarose	0,8 g
1x TAE –Puffer	100 ml
Ethidiumbromid 1%	6 µl

- Puffer für Agarose-Gel:

1x TAE-Puffer	400 ml
Ethidiumbromid 1%	24 µl

- DNA-Marker:

Hae III/ HINDIII	1 µl
Aqua dest.	9 µl
6x Puffer	2 µl

Plasmide

- Reaktionsansatz für Subklonierung:

Cloning Buffer	3 µl
PCR-Fragment (1:10 verdünnt)	2 µl
Vector Mix	1 µl

- Verdau-Ansatz:

Plasmid (1 µg/µl)	7 µl
Xba I (20 U/µl)	0,5 µl
HIND III (20 U/µl)	0,5 µl
NEB 2 (10x)	1 µl
BSA (10x)	1 µl

Western-Blot

• Lysis-Puffer:

Tris-HCl pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
Glycerol	10% (v/v)
EDTA	2 mM
Nonidet P 40	1%

• Trenngel für Gelelektrophorese (12%):

Acrylamid (30%)	6 ml
H ₂ O	5 ml
Tris 1,5M (pH 8,8)	3,8 ml
SDS (10%)	0,15 ml
APS (10%)	0,15 ml
TEMED	6 µl

• Sammelgel für Gelelektrophorese:

Acrylamid (30%)	0,67 ml
H ₂ O	2,7 ml
Tris 1,0M (pH 6,8)	0,5 ml
SDS (10%)	0,04 ml
APS (10%)	0,4 ml
TEMED	0,004 ml

- 10x Elektrophorese-Puffer für SDS-PAGE (auf 2 l Aqua dest.):

Tris Base	240 mM
Glycin	2,5 M
SDS	30 mM

- Transferpuffer Naß-Blot (pH 8,3) (auf 1 l Aqua dest.):

Tris	20 mM
Glycin	190 mM

- Strippuffer:

Tris/HCL pH 6,8	62,5 mM
SDS	2% (w/v)
2-Mercaptoethanol	100 mM

- Block- und Waschpuffer (3% Milch/PBS)

Magermilchpulver	3 g
PBS	100 ml

Immunzytochemie

- Inkubationslösung:

PBS	100 ml
BSA	3 g
NP 40	300 µl

2.4 Antikörper

- **Primärantikörper**

Tabelle 1 *Verwendete Primärantikörper*

Name	Herkunft	Hersteller
Anti- β -Actin	Maus, monoklonal	Sigma
Anti-EGFR	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz
PhosphoDetect Anti-EGFR	Maus, monoklonal	Calbiochem
Anti-MAP Kinase 1/2	Kaninchen, polyklonal	upstate
Aktivierte Anti-MAP Kinase	Maus, monoklonal	Sigma
Anti-EGFR-FITC		Santa Cruz
Anti-TGF- α		Santa Cruz
Anti-Cyclin-D1	Maus, monoklonal	Santa Cruz

- **Sekundärantikörper**

Als Sekundärantikörper wurden verwendet: Anti-Maus-Antikörper (HRP-gekoppelt) und Anti-Kaninchen-Antikörper (HRP-gekoppelt) der Firma Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

2.5 Kits

- First Strand cDNA-Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)
- QIAgen RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)
- Red Taq PCR Polymerase Mix (Sigma-Aldrich, St.Lois, MO, USA)
- StrataClone PCR Cloning Kit (Stratagene Products Division, La Jolla, CA, USA)

2.6 Oligonukleotid-Primer

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden bei der Firma Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) hergestellt. Die nachfolgend aufgeführte Identifikationsnummer der Primer korrespondiert mit der Gensequenz des EGFR-Wildtyps (NM_005228 Genbank NCBI, NIH, Bethesda, MD).

5'-Primer

Tabelle 2 *Verwendete 5'-Primer*

109	5' AGACCGGACGACAGGCCA 3'
164	5' AACGCCACAACCACCGC 3'
1132	5' CCCCCTAATTATGTGGTGACAGATC 3'
1527	5' CGGCAGGACCAAGCAACA 3'
1569	5' CAGCCTGAACATAACATCCTTG 3'
2583	5' CATCTGCCTCACCTCCACCG 3'

3'-Primer

Tabelle 3 *Verwendete 3'-Primer*

1569	5' CAAGGATGTTATGTTTCAGGCTG 3'
2565	5' CAGCAGGCGGCACACG 3'
2583	5' CGGTGGAGGTGAGGCAGATG 3'
2928	5' CCCGTAGCTCCAGACATCACTC 3'
3927	5' CTGCTGTGGCTTGGTCCTG 3'
4030	5' AATGTGCCCCGAGGTGGAAGTA 3'

2.7 Zelllinien

Die UM-SCC- und UT-SCC-Zelllinien wurden freundlicherweise von Dr. Thomas E. Carey (University of Michigan, MI, USA) und Dr. Reidar Grénman (University of Turku, Finnland) zur Verfügung gestellt. Die UMB-SCC-Zelllinien stammen aus dem Zentrum für Hals-, Nasen-, Ohren-Heilkunde der Universität Marburg [27, 28].

Tabelle 4 *Aufstellung der verwendeten Zelllinien*

Name	Lokalisation des Primär- tumors	Herkunft der Probe	TNM	Grading	Alter	Geschlecht
UM-SCC-1	Mundboden	Primärtumor	T2N0M0	G2	73	männlich
UM-SCC-3	Nasencolumella	Lymphknoten	T1N0M0	G1-2	73	weiblich
UM-SCC-4	Tonsille	Primärtumor	T3N2aM0	G3	47	weiblich
UM-SCC-14A	Mundboden	Primärtumor	T1N0M0	G2-3	58	weiblich
UM-SCC-22B	Hypopharynx	Lymphknoten	T2N1M0	G2	58	weiblich
UM-SCC-27	Vordere Zunge	Lymphknoten	T1N0M0	unbekannt	62	männlich
UMB-SCC-745	Oropharynx	Primärtumor	T4N2M0	G2	48	männlich
UMB-SCC-864	Zungenrand	Primärtumor	T2N2M0	G2	59	männlich
UMB-SCC-969	Tonsille	Primärtumor	T4N2M0	G2	67	männlich
UT-SCC-24A	Vordere Zunge	Primärtumor	T2N0M0	G2	41	männlich
UT-SCC-26A	Hypopharynx	Lymphknoten	T1N2M0	G2	60	männlich

Die *Madine-Darby canine kidney* Zelllinie C7 (MDCK-C7-Zelllinie), welche im Invasions-Assay verwendet wurden, ist eine weit etablierte epitheliale Zelllinie, die aus dem Gewebe einer Hundeniere gewonnen wurde.

2.8 Restriktionsenzyme und Puffer

Für die Subklonierung wurden die Restriktionsenzyme Xba I und HIND III (New England Biolabs Beverly, MA, USA) eingesetzt.

2.9 Geräte

- BD FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Brutschrank, Heraeus Instruments (Kendo Laboratory Products GmbH, Langenselbold)
- Eppendorf Bio Photometer (Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg)
- Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- 5ml-Polystyrol Rundboden-Röhrchen mit in der Kappe integriertem Zellsieb (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Heizblock für Tubes, HCL HBT 130, Kobe, Japan
- High Performance Ultraviolet Transluminator (UVP, Upland, CA, USA)
- Incubator Shaker (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)
- Laser Scanning Mikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)
- Mikrofiltermembranen für Invasions-Assay mit einer Porengröße von 0,4 μm und einer Oberfläche von 4,25 cm^2 (Thin-Certs, Greiner Bio-One, Frickenhausen)
- Profesional Thermocycler (Biometra, Göttingen)
- Schwenker (Heidolph Instruments Duomax 1030, Kobe, Japan)
- Voltohmmeter (EVOM, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)
- Zentrifuge Function line, Heraeus Instruments (Kendo Laboratory Products GmbH Langenselbold)

2.10 Software

- Codon Code Aligner (Codon Code Corporation, Dedham, MA, USA)
- ModFit LT Software (Mac systems)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die HNSCC-Zelllinien werden bei konstanten 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und 5% CO₂ kultiviert. Um einen mikrobiellen Befall der Kulturen zu vermeiden, werden alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Als Nährmedium wird DMEM verwendet. Diesem werden 10% fötales Kälberserum, 25mM HEPES, Penicillin, Streptomycin, Amphotericin, Gentamycin und L-Glutamin zugegeben.

Zum Splitten der Zellen wird das Nährmedium abgesaugt. Der Zellrasen wird mit PBS gespült. Zum Lösen der Zellen vom Gefäßboden folgt eine ca. zehn minütige Inkubation der Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (0,025% Trypsin, 0,05% EDTA) bei einer Temperatur von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Die Zellsuspension wird mit frischem Medium versetzt und in einem neuen Kulturgefäß ausgesät. Um eine kontinuierliche Kultur zu erhalten, werden die Zellen nicht höher als 1:10 verdünnt. Hierzu wird eine Zellzahlbestimmung (Neubauer-Zählkammer) durchgeführt. Frisch trypsinisierte Zellen werden in einem kleinen, definierten Volumen aufgenommen und ein Tropfen der Suspension zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Es folgt eine Auszählung von jeweils vier großen Quadraten. Die ursprüngliche Konzentration erhält man nach Berechnung des Mittelwertes für ein Quadrat unter Berücksichtigung der Verdünnung.

Aliquote der verwendeten Zellen werden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu werden die Zellen trypsinisiert, in frischem Medium aufgenommen und für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellpellets werden auf Eis in einer eiskalten Lösung (10% DMSO/Medium) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Um ein langsames Abkühlen der Zellen zu gewährleisten, werden die Röhrchen mit Papiertüchern umwickelt und zunächst bei -80°C über Nacht eingefroren. Am Folgetag erfolgt schließlich die Überführung der Röhrchen in flüssigen Stickstoff.

Zur erneuten Kultivierung werden die Zellen dem Stickstoff entnommen, in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend vom beigefügten Gefriermittel (10%

DMSO) gereinigt. Die Zellen werden in eine Zellkulturschale ausgesät und unter oben beschriebenen Bedingungen erneut kultiviert.

3.2 RT-PCR, Subklonierung und Sequenzierung

Um die elf Zelllinien vollständig auf Veränderungen innerhalb der Gensequenz zu untersuchen, wird die RNA der Zelllinien isoliert, in komplementäre DNA (cDNA) überführt und mittels PCR amplifiziert. Anschließend erfolgt die Subklonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte. Der genaue Ablauf wird nachfolgend genauer beschrieben.

3.2.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA wird das RNeasy MIDI Kit der Firma QIAGEN (Qiagen, Hilden) verwendet. Es wird nach den Vorgaben des Herstellers vorgegangen. Da ein hohes Risiko des Abbaus und der Beschädigung der RNA durch ubiquitär vorhandene RNAsen besteht, werden die folgenden Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen und mit besonderer Vorsicht vollzogen. Zunächst erfolgt das Entfernen des Nährmediums. Jede Zellkulturplatte wird mit 0,8 ml RLT-Puffer versetzt. Die gelösten Zellen werden in 15ml-NUNC-Röhrchen überführt. Um die Zellen zu homogenisieren, wird das Lysat zwanzigmal durch eine 18er Kanüle gezogen. Im Anschluss wird das Lysat mit 4 ml 70% Ethanol versetzt, in eine Filtersäule überführt und 10 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Dann erfolgt die Benetzung der Säule mit 4 ml RW1-Puffer. Nach Zentrifugation und Verwerfen des Durchflusses wird die Säule mit 2,5 ml RPE-Puffer versetzt und erneut zentrifugiert. Die Filtersäule wird nun in ein neues Röhrchen überführt und zum Lösen der RNA mit 300 µl RNase-freiem Wasser versetzt und 1 Minute inkubiert. Zur Gewinnung der gelösten RNA wird die Säule anschließend 5 Minuten zentrifugiert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt mittels photometrischer Bestimmung.

3.2.2 Reverse Transkription

Mittels der Reversen Transkriptase ist es möglich, RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Diese DNA-Form zeigt ein geringeres Risiko im Hinblick auf Abbau und Beschädigung durch ubiquitär vorhandene RNAsen.

Zur Herstellung von cDNA wird das *First Strand cDNA-Synthesis Kit* (Roche) verwendet. Hierbei dient der Poly-Adenosin-Schwanz, der sich am 3'-Ende der messengerRNA (mRNA) befindet, als Ansatzpunkt für einen komplementären Primer. Dieser sogenannte Oligo-(dT)-Primer besteht aus einer Kette von Thymidin-Basen.

Zunächst wird ein Reaktionsansatz aus 1 µg RNA und 1 µl Oligo-(dT)-Primer (0,8µg/µl) hergestellt. Es folgt die Zugabe von Wasser bis zu einem finalen Volumen von 12,5 µl. Dieser Ansatz wird über 10 Minuten bei 65°C im Heizblock inkubiert.

Anschließend erfolgt die Zugabe eines Master Mix aus 4 µl 10x Puffer, 2 µl Desoxynukleotid-Mix, 0,5 µl RNase-Inhibitor und 1 µl Reverser Transkriptase (20 U/µl). Schließlich wird der Ansatz über 1 Stunde bei 55°C und 5 Minuten bei 85°C im Thermocycler inkubiert, um das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase zu gewährleisten.

Bevor die cDNA als Template in den PCR-Ansatz überführt wird, erfolgt eine Konzentrationsbestimmung des synthetisierten Materials. Die Reaktionsröhrchen werden bei -20°C gelagert.

3.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Hierbei wird eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq) eingesetzt.

Ein Reaktionsansatz besteht aus DNA, sequenzspezifischen Primern, Nukleotiden und der thermostabilen Polymerase, welche die DNA vervielfältigt.

Ein 25µl-Ansatz setzt sich aus folgendermaßen zusammen:

Red Taq Mix	12,5 µl
5`Primer	0,5 µl
3`Primer	0,5 µl
Aqua dest.	10,5 µl
Template	1 µl

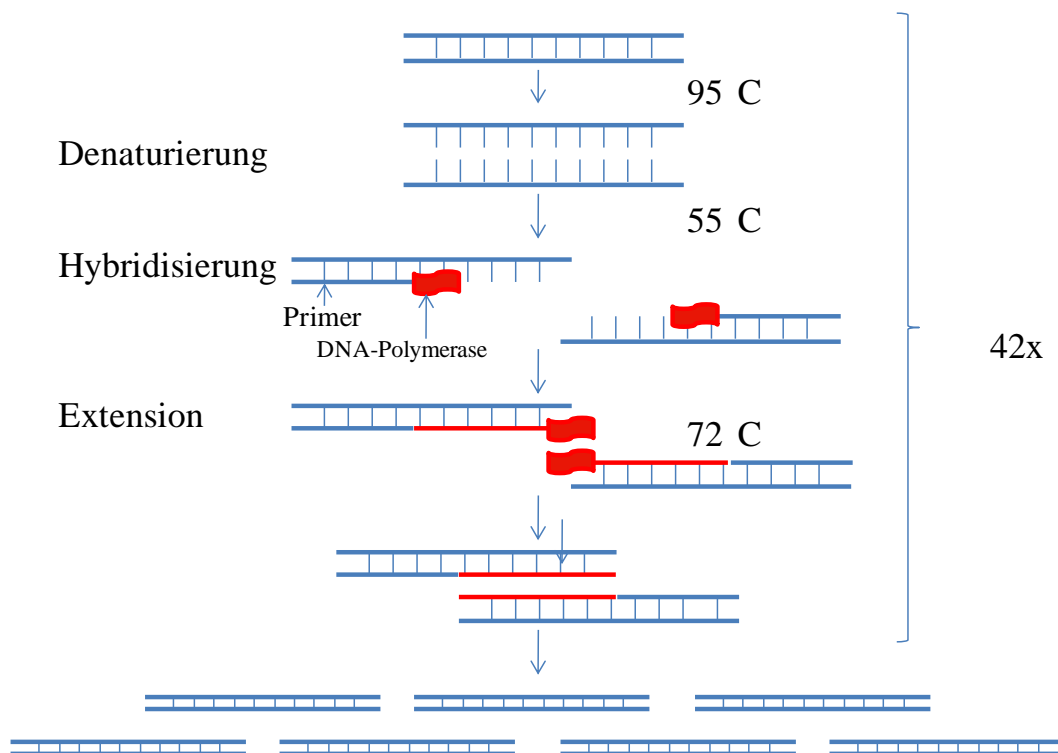


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung einer PCR

Die PCR wird in einem Thermocycler mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

1. 96°C 10 min
2. 96°C 1 min (Denaturierung)
3. 55°C 2 min (Annealing)
4. 72°C 5 min (Extension)
5. Schritt 2-4 42 Zyklen
6. 72°C 15 min

Zuerst werden die komplementären DNA-Doppelstränge durch das Erhitzen auf 96°C gespalten. Durch das Herabsetzen der Temperatur auf 55°C lagern sich die Primer an, welche als Startpunkt für die DNA-Synthese dienen. Bei einer Temperatur von 72°C erfolgt durch die Polymerase die Bindung komplementärer Nukleotide an den DNA-Einzelstrang und Synthese eines komplementären DNA-Stranges, was so zu einer Verdopplung der DNA-Stränge bei jedem Zyklus führt (siehe Abbildung 3.1).

3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können Nukleinsäuren oder Proteine verschiedener Größe getrennt werden. Durch eine Gelextraktion können DNA-Fragmente einer bestimmten Größe gewonnen werden. Restriktionsreaktionen von Plasmid-DNA werden mittels der Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

Hierfür werden 100 ml 1x TAE Puffer mit 0,8 g Agarose versetzt und solange erwärmt bis sich die Agarose komplett gelöst hat. Diese Lösung wird in die Gießform gefüllt und mit 6 µl Ethidumbromid versetzt. Die Geltaschen werden durch einen Kamm gebildet, der in die noch flüssige Agaroselösung gesetzt wird. Die Gießform wird unter dem Abzug ausgehärtet.

Das ausgehärtete Gel wird in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Anschließend wird die Kammer mit 400 ml 1x TAE Puffer und 24 µl Ethidiumbromid befüllt, bis das Gel komplett von Puffer bedeckt ist. Die Geltaschen werden mit einem Marker und den DNA-Proben befüllt. Zu den DNA-Proben der Restriktionsreaktionen wird Ladepuffer (Verhältnis Probe:Puffer = 5:1) zugegeben. Die Elektrophorese wird bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt. Die DNA-Fragmente werden nach ihrer Größe aufgetrennt, da die negativ geladene DNA zur Anode wandert und durch das Agarosegelnetz je nach Größe stärker zurückgehalten wird.

Mit Hilfe eines Transiluminators und UV-Lichts wird die Fluoreszenz von Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert, angeregt. Dieses DNA-Bandenmuster wird mit einem Geldokumentationsprogramm festgehalten.

3.2.5 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach präparativer, elektrophoretischer Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Hilfe eines 0,8%-igen Agarose-Gels werden die DNA-Banden durch UV-Licht-Bestrahlung sichtbar gemacht und die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die DNA wird dann mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kits aus dem Gel gelöst und aufgereinigt. Dabei wird nach den Empfehlungen des Herstellers (QIAquick Handbuch) vorgegangen. Hierfür werden die Proben zunächst gewogen. Das dreifache Gelvolumen QG-Puffer wird den Proben beigelegt. Zum Lösen des Gelstücks wird die Probe über 10 Minuten bei 50°C erhitzt und alle 2-3 Minuten gevortext. Nach vollständigem Lösen wird die Probe mit einem Gelvolumen Isopropanol versetzt, gemischt und auf eine Filtersäule überführt. Nach einer Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 U/min wird der Durchfluss verworfen, 500 µl QG-Puffer auf die Filtersäule gegeben und erneut für 1 Minute zentrifugiert. Es folgt das Waschen des Filters mit 750 µl PE-Puffer, sowie eine anschließende Zentrifugation. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wird die Säule ein weiteres Mal zentrifugiert. Schließlich wird der Filter in ein frisches Röhrchen überführt und die Filtermembran mit 30 µl Elutionspuffer benetzt. Durch Zentrifugation wird die DNA aus dem Filter gelöst.

3.2.6 Subklonierung

Für die Subklonierung der DNA-Fragmente wird das StrataClone PCR Cloning Kit von Stratagene verwendet. Es wird nach den Anweisungen des Herstellers Stratagene vorgegangen. Nach Isolierung der DNA-Fragmente wird ein Reaktionsansatz aus 3 µl Kloning Puffer, 2 µl einer 1:10 verdünnten PCR-Reaktion und 1 µl Vector Mix hergestellt. Dieser Ansatz wird bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Die auf Eis aufgetauten, kompetenten Bakterienzellen werden mit 1 µl des Ansatzes versetzt. Dieser Transfusions-Mix wird für 20 min auf Eis inkubiert, bei 42°C für 45 Sekunden erhitzt und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Durch diese Hitzeschock-Transformation wird das Plasmid von den Bakterien aufgenommen. 250 µl vorgewärmtes LB-Medium wird der Reaktion zugeführt. Bei 37 °C wird die Transformations-Reaktion dann für 1 Stunde im Shaker inkubiert. Anschließend werden 10 µl der transformierten

Bakterienzellen auf LB-Ampicillin-Platten aufgetragen. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.7 Selektion positiver Klone

Zur Selektion positiver Klone werden die Agar-Platten mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) bestrichen. Als chromogenes Substrat für β -Galaktosidase dient es dem Blau-Weiß-Screening von Bakterienkolonie. In der codierenden Sequenz der β -Galactosidase des Vektors liegt eine *Multiple Cloning Site*, in die PCR-Fragmente eingebracht werden können. Dadurch wird die Gensequenz der β -Galactosidase unterbrochen und das Enzym nicht mehr exprimiert. X-Gal wird nicht mehr gespalten und somit kein blauer Farbstoff produziert. Bei weißen Klonen handelte es sich daher um Klone, bei welchen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine DNA-Sequenz eingefügt wurde.

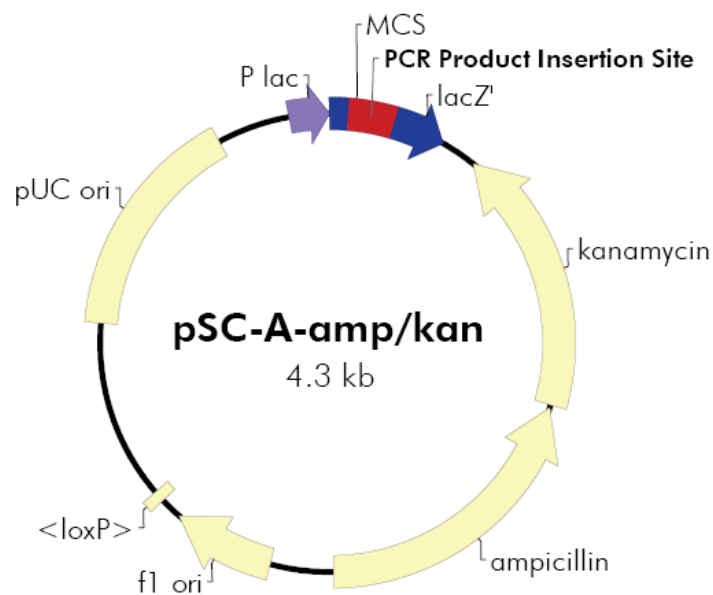


Abbildung 3.2 *PCR Cloning Kit-Vektor mit Insertionstelle (rot)*. Abbildung aus dem PCR Cloning Kit Handbuch mit freundlicher Genehmigung der Firma Agilent-Stratagene.

3.2.8 Übernacht-Kulturen

Weiße Kolonien werden mit einer Pipettenspitze von der Agar-Platte isoliert. 5 ml LB-Medium werden damit angeimpft. Zur Selektion werden 100 µg/ml Ampicillin als selektierendes Antibiotikum hinzu gegeben, da die transformierten Bakterienzellen durch das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz aufweisen. Die Kultur wird bei 37 °C für ungefähr 16 Stunden im Schüttelinkubator herangezogen.

3.2.9 Plasmid-Minipräparation

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wird das QIAprep Spin Miniprep Kit von QIAGEN benutzt. Die Übernachtskulturen werden in einem 5ml-Gefäß zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das am Boden der Gefäße befindliche Pellet wird mit 250 µl P1-Lösung resuspendiert und in ein 2ml-Eppendorfröhrchen überführt. Dann wird es mit 250 µl P2-Lösung versetzt. Die Lösung wird mit 350 µl Lösung N3 versehen, gemischt und bei 13000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wird auf eine QIAGEN-Säule gegeben und für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, 500 µl PB-Puffer auf den Filter aufgetragen und zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen. Die Säule wird nun mit 750 µl PE-Puffer versetzt und bei 13000 U/min für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen und die Säule für mindestens 1 Minute zentrifugiert.

Die Plasmid-DNA wird in 30 µl EB-Puffer in einem neuen 1,5 ml-Eppendorfröhrchen für 1 Minute eluiert.

3.2.10 Restriktion

Zur Verifikation der Klone wird die DNA-Probe mit Restriktionsenzymen, dazugehörigen Puffern, 10xBSA-Lösung und Wasser versetzt und in einem verschlossenen 1,5ml-Eppendorfröhrchen für 37 °C für mindestens 2 Stunden inkubiert. Dabei wird das Zielgen durch die beiden Restriktionsenzyme aus dem Plasmid herausgeschnitten. Ein typischer Ansatz eines Verdaus von Plasmid-DNA ist im Folgenden exemplarisch aufgelistet:

7.0 µL	Plasmid-Template (1 µg/µl)
1.0 µL	NEB 2 (10x)
1.0 µL	BSA-Lösung (10x)
0.5 µL	Xba I (20 U/µl)
0.5 µL	HIND III (20 U/µl)

Anschließend werden die Restriktionsproben in einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und auf eine erfolgreiche Subklonierung untersucht.

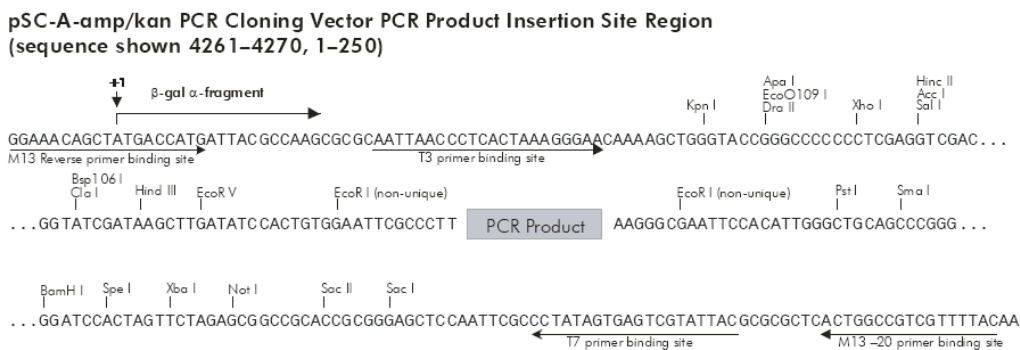


Abbildung 3.3 Plasmidsequenz im Bereich der Insertionsstelle mit den vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Abbildung aus dem PCR Cloning Kit Handbuch mit freundlicher Genehmigung der Firma Agilent-Stratagene.

3.2.11 DNA-Sequenzierung

Nach einer Plasmid-Minipräparation wird jeweils 1 µg Plasmid durch die Firma 4base lab (Reutlingen) sequenziert, um die Zelllinien auf Veränderungen der Gensequenz zu untersuchen.

3.2.12 Dauerkulturen

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienzellen werden Glycerin-Stocklösungen hergestellt, die bei -80°C gelagert werden. Hierzu werden 1500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl einer sterilen Glycerin-Lösung (70%) versetzt.

3.3 Analyse von Proteinen

3.3.1 Proteinextraktion

Zunächst wird das Nährmedium der Zellkulturen entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS gespült. Jede Platte wird mit etwa 1,5 ml Trypsin benetzt. Nach einer vollständigen Lösung der Zellen vom Boden der Platte wird die Suspension in 8 ml Medium aufgenommen und in ein NUNC-Tube überführt. Es folgt eine Zentrifugation der Röhrchen für 5 Minuten bei 3800 U/min und 4°C in der vorgekühlten Zentrifuge. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet mit 8 ml PBS gespült und erneut zentrifugiert. Lysispuffer wird mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren versetzt, um die Wirkung von zelleigenen Proteasen und Phosphatasen zu verhindern. Das Pellet wird in seinem doppelten Volumen Puffer gelöst. Das Lysat wird in Eppendorfröhrchen überführt. Anschließend folgt eine quantitative Bestimmung der Proteine nach Bradford und eine Konzentrationsbestimmung mittels Photometer.

3.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt mit dem *Bio-Rad Protein-Assay Dye Reagent Concentrate*. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford. Hierbei führen verschiedene Proteinkonzentrationen durch Bindung von Proteinen an einen Farbstoff zu proportionalen Farbveränderungen. Diese wird bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer bestimmt. Als Standard wird BSA mitgeführt. Die Proteinbestimmung wird nach den Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 5 *Ansatz für Proteinbestimmung nach Bradford*

	Leerwert	Standard 1:2	Standard 1:4	Standard 1:6	Standard 1:8	Standard 1:10	Probe
Biorad 1:5	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
BSA	-	1 µl	2 µl	3 µl	4 µl	5 µl	-
Lysis-Puffer	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	-
Probenextrakt	-	-	-	-	-	-	3 µl

3.3.3 Probenvorbereitung für die Western Blot-Analyse

Die Proteinproben werden mit Probenpuffer (Roti-Load) versetzt und 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Pro Geltasche werden jeweils 22 µl der Proben (35 µg Proteine) aufgetragen.

3.3.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung und Überprüfung der Reinheit von Proteinen wird die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt. Hierbei werden die Proteine durch SDS mit einer einheitlichen negativen Ladung versehen. So wird das Laufverhalten bei einer Auftrennung im elektrischen Feld nicht mehr durch die variierende Ladung beeinflusst, sondern hängt nur noch von ihrer Größe der Proteine ab. Die Trennung erfolgt wie beim Agarosegel über das Wandern der negativ geladenen Proteine zur Anode, welche durch das Acrylamid-Netz gemäß ihrer Größe gebremst wird.

Die Gele werden dabei, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben, vorbereitet. Das Trenngel wird während der Polymerisation mit einem dünnen Film Isopropanol benetzt, um eine glatte Oberfläche zu gewährleisten. Der Isopropanolfilm wird anschließend entfernt und das Sammelgel aufgegossen. Zur Bildung von Geltaschen werden Kämme eingesetzt.

Dem Einbau der polymerisierten Gele in die Kammer folgt das Füllen des Kathoden- und Anodenraums der Kammer mit SDS-Laufpuffer. Anschließend werden die Kämme langsam aus dem Gel herausgezogen und die Taschen mit der zu untersuchenden Probe gefüllt. Pro Geltasche werden jeweils 35 µg Proteine aus Zelllysaten aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wird ein Proteinstandard von BioRad (Precision Plus Protein All Blue Standard, BioRad Laboratories) verwendet.

Zunächst wird für 10 Minuten eine Spannung von 80 V angelegt, um die Proteine in das Sammelgel einlaufen zu lassen. Im Anschluss wird die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt.

3.3.5 Protein-Blotting

Das Naß-Blot-Verfahren wird verwendet, um die Proteine von der SDS-PAGE auf Nitrozellulose-Membranen zu überführen.

Hierbei wird eine senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtete Spannung von 100 V über 1 Stunde angelegt. Dabei wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran. Im Anschluss werden die Membranen in 3% Magermilch/PBS inkubiert. Das sogenannte Blocken dient dazu freie, unspezifische Proteinbindungsstellen zu besetzen.

3.3.6 Protein-Detektion

Die auf der Membran haftenden Proteine können mittels spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden.

Dazu werden die geblockten Membranen mit verschiedenen, Protein-spezifischen Antikörpern versetzt. Hierfür werden die Membranen mit einer Inkubationslösung (3% Magermilchpulver/PBS) bedeckt und der Antikörper zugegeben. Von Antikörper zu Antikörper variiert hierbei die Konzentration, sowie die Dauer der Inkubation (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 *Verwendete Antikörper*

Name	Konzentration	Spezies	Inkubationsdauer
Anti- β -Aktin	1:4000	Maus	2-3 Stunden
Anti-EGFR	1:500	Kaninchen	2-3 Stunden
PhosphoDetect Anti-EGFR	1:250	Maus	über Nacht
Anti-MAP Kinase1/2	1:5000	Kaninchen	2-3 Stunden
Aktivierte Anti-MAP Kinase	1:3000	Maus	über Nacht
Anti-Cyclin-D1	1:500	Maus	über Nacht

Um eine gleichmäßige Verteilung des Antikörpers zu gewährleisten, wird die Inkubation auf einem Schwenkbrett durchgeführt.

Anschließend werden die Membranen 3 x 5 Minuten mit Blockpuffer gewaschen. Es folgt eine Inkubation mit einem HRP-konjugierten, Spezies-spezifischen Zweit-Antikörper in einer Konzentration von 1:2000 über 1 Stunde. Die Membranen werden anschließend erneut 3 x 5 Minuten gewaschen. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen werden die Membranen mit ECL benetzt. Diese Detektionslösung besteht aus zwei einzelnen Komponenten, die kurz vor dem Auftragen auf die Membran im Verhältnis 1:1 gemischt werden. Die Exposition auf Röntgenfilm wird in einer Röntgenkassette vorgenommen, in der die Membranen ausgelegt und mit dem Film bedeckt werden. Mittels dieser Methoden können spezifische Antikörperbindungen mit dem spezifischen Protein als Bande sichtbar gemacht werden.

3.4 Immunzytochemie unstimulierter Zellen

Zunächst werden Zellen in sechsfach Wells auf Deckgläsern kultiviert. Als Kulturmedium wird DMEM verwendet. Dann werden die Zellen in Methanol bei -20°C fixiert. Mit einer Lösung aus 3% BSA und 0,3% NP40 in PBS (Inkubationslösung) erfolgt eine Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit anschließender Zugabe eines TGF- α -spezifischen Antikörpers für 1,5 Stunden. Anschließend werden die Deckgläser dreimal jeweils 5 Minuten mit Puffer gewaschen. Es folgt die Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper über eine Stunde. Nach jeweils dreimaligem Waschen mit dem Inkubationspuffer, PBS und Wasser werden die Deckgläser den Schalen entnommen. Es werden ca. 20 μ l *Fluorescent Mounting Media* der Firma Dako Cytomation auf einen frischen Objektträger gegeben. Das Deckglas wird mit der Zellschicht nach unten auf den Objektträger überführt und 15 Minuten getrocknet. Es folgt eine Versiegelung mit klarem Nagellack.

Die Begutachtung der FITC-Signale erfolgt unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Fluorview, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg).

3.5 Immunzytochemie stimulierter Zellen

Für die immunzytologische Untersuchung stimulierter Zellen werden die Zellen zunächst auf Deckgläsern in 6-Wellplatten kultiviert. Sobald der Zellrasen ausreichend ausgebildet ist, wird den Zellen in steigender Konzentration TGF- α zugesetzt.

Tabelle 7 *Versuchsansatz zur immunzytochemischen Untersuchung unter TGF α -Stimulation*

Well-Nr.	1	2	3	4	5	6
TGF- α -Konzentration	0 ng/ml	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	Kontrolle

Anschließend werden die Zellen wie in 3.4 beschrieben fixiert. Es folgt die Inkubation mit einem kombinierten EGFR-FITC-Antikörper (1:250) für 1,5 Stunden. Die Zellen werden jeweils dreimal mit der Inkubationslösung, PBS und Wasser gespült. Die Deckgläser werden den Wells entnommen, auf einen frischen, mit *Fluorescent Mounting Media* (Dako Cytomation, USA) versehenen Objektträger aufgelegt, getrocknet und mit Nagellack versiegelt.

3.6 FACS-Analyse

Mittels der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) lassen sich durch einen Nukleinsäurebindenden Farbstoff (Propidium Jodid) Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt und somit die Zellzyklus-Verteilung von Zellen ziehen.

Die Zellen werden nach Tabelle 8 für 14 Stunden mit den Inhibitoren AG1478, Cetuximab sowie dem EGFR-Liganden TGF- α bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht haben, wird das Nährmedium der Zellkulturen abgesaugt und die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,025% Trypsin; 0,05% EDTA) versetzt. Die gelösten Zellen werden in Medium aufgenommen und in Falcon-Röhrchen überführt. Diese werden für 5 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets am Boden der Röhrchen werden in 0,5 ml eiskaltem PBS gelöst. Zwei ml eiskaltes 100%-iges Ethanol werden in ein frisches Falcon-Röhrchen pipettiert und vorsichtig geschüttelt. Die in PBS suspendierten Zellen werden langsam tropfenweise den frischen Röhrchen zugegeben. Die Zell-Ethanol-Lösung wird für 4 Stunden bei -20°C fixiert. Anschließend werden die Zellen bei 5000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden in PBS resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand abermals verworfen. Die Pellets

werden in 1 ml RNase A-Lösung (50 µg/µl) aufgenommen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Kurz vor der Messung werden die Zellsuspensionen durch ein Zellsieb (Becton Dickinson) in ein 5 ml *Round Bottom Tube* (Falcon, Becton Dickinson) überführt und mit 15 µl Propidium Jodid (50 µg/µl) gefärbt. Die FACS-Analyse wurde mittels des BD FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt und mit der ModFit LT Software von Mac systems ausgewertet.

Tabelle 8 *Schematische Darstellung der Vorbehandlung der Zelllinien*

Proben-Nr.	A1	A2	A3	A4	C1	C2	C3	C4
TGF- α	0 ng/ml	0 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	0 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml	0 ng/ml
Cetuximab	-	-	-	-	0 µg/ml	0 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
AG 1478	0 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	0 µg/ml	-	-	-	-

3.7 Invasions-Assay

Der Invasions-Assay dient der kontinuierlichen Untersuchung der Krebsinvasion, die sich zuerst durch funktionelle Veränderungen äußert. Dieser Assay macht sich den hohen transepithelialen, elektrischen Widerstand (TEER) eines epidermalen MDCK-Zell-Monolayers [13] als Indikator zu Nutze, durch den sich Rückschlüsse auf die Unversehrtheit und Durchlässigkeit des Monolayers ziehen lassen. Der Widerstand wird umso größer, je dichter die epidermale Zellschicht ausgebildet ist. Eine Invasion von Zellen in die MDCK-Zellschicht macht sich durch einen Abfall des TEER bemerkbar. Für diese Untersuchung werden MDCK-C7-Zellen konfluierend auf einer Mikrofiltermembran mit einer Porengröße von 0,4 µm und einer Oberfläche von 4,25 cm² in 6-Wellplatten in DMEM kultiviert (siehe Abbildung 3.4). Diese Zelllinie entwickelt einen hohen transepithelialen, elektrischen Widerstand und wird als zelluläre Barriere im Invasions-Assay verwendet. Anschließend wird eine definierte Zellmenge von je 750.000 Krebszellen einer der untersuchten Zelllinien in 1 ml DMEM auf diese epitheliale Barriere ausgesät, die zuvor über 14 Stunden mit dem EGFR-Liganden TGF- α inkubiert wurden. Die Zellzahl wird hierfür mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Als negative Kontrolle dienen sowohl MDCK-C7-Zellen als auch Zelllinien in unstimulierter Form, die in gleicher Zellzahl auf die MDCK-Zellschicht aufgebracht werden. Der transepitheliale elektrische Widerstand (TEER) wird während der

folgenden Tage mittels eines Volttohmmeters (EVOM, World Precision Instruments, USA) gemessen und mit den Kontrollwerten verglichen. Bei einem Eindringen der Testzellen in die Barrierschicht der MDCK-Zellen kommt es zu einem plötzlichen, rapiden Abfall des Widerstandes, welcher mit der Invasivität der Tumorzellen korreliert.

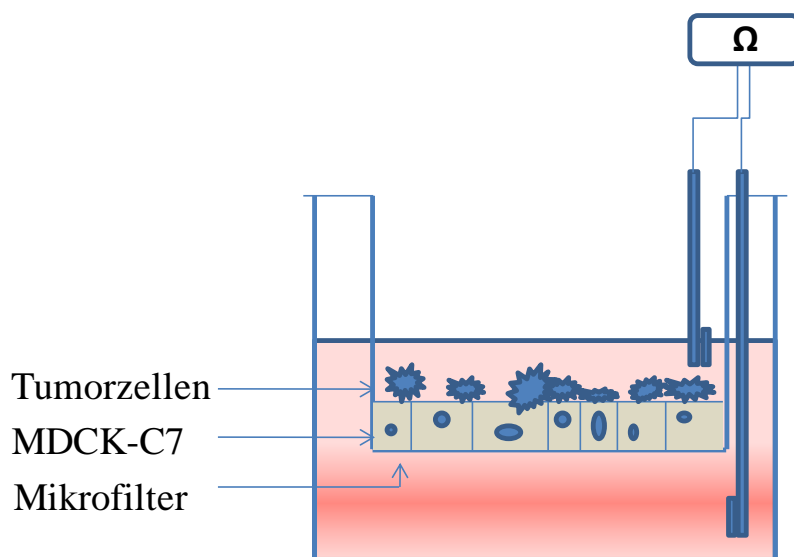


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Messung des TEER. Abgebildet sind ausgesäte Tumorzellen, MDCK-C7-Barrierschicht, Mikrofiltermembran.

4 Ergebnisse

4.1 EGFR-Mutationsstatus in HNSCC-Zelllinien

Der gesamte *open reading frame* des EGF-Rezeptors von elf zuvor charakterisierten Zelllinien aus Tumoren des Kopf- und Halsbereichs wurde auf Veränderungen in der Gensequenz untersucht, um potentielle Sequenzveränderungen des EGF-Rezeptors zu erfassen, die zu einer Sensitivitätsveränderung der Zelllinien gegenüber Liganden oder Inhibitoren führen könnten. Hierzu wurde eine RT-PCR-Sequenzierung mit darauf folgender Sequenzanalyse (*Codon Code Aligner*, Codon Code Corporation, USA) durchgeführt. Als Referenz diente die Wildtyp-Sequenz des EGF-Rezeptors (NM_005228; Genbank, NCBI, NIH, Bethesda, MD, USA). Um möglichen Artefakten durch PCR-Fehler vorzubeugen, wurden die RT-PCR, die Subklonierung und Sequenzierung zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Keine der elf untersuchten Zelllinien wies eine Mutation innerhalb der Tyrosin-Kinase-Domäne des Rezeptors auf (siehe Tabelle 9). In vier von elf Zelllinien (36% der untersuchten Zelllinien: UM-SCC-14A, -27, UMB-SCC-969, UT-SCC-24A) zeigte sich interessanterweise das Vorliegen eines Polymorphismus in Kodon 497, welcher für die Aminosäure Lysin (K) anstelle der häufiger auftretenden Aminosäure Arginin (R) kodiert.

Stille Mutationen konnten in Kodon 134 innerhalb der Zelllinien UM-SCC-1, -14A, -27, UMB-SCC-745, -969 (45%) beobachtet werden. Ebenso zeigten sich Sequenzveränderungen, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führten, in Kodon 605 der Zelllinien UM-SCC-14A, -27, UMB-SCC-864 und -969 (36%). Kodon 763 war hiervon in den Zelllinien UM-SCC-22B und UT-SCC-24A betroffen (18%). In Kodon 879 (9%) konnte eine stille Mutation innerhalb der Zelllinie UMB-SCC-864 beobachtet werden.

Aufgrund der Ergebnisse bei der Sequenzanalyse mit der Identifikation von 4 Zelllinien mit dem K497-Polymorphismus wurden in allen weiteren Untersuchungen HNSCC-Zelllinien, welche den R497-Polymorphismus im EGF-Rezeptor aufweisen mit solchen

verglichen, bei denen der K497-Polymorphismus vorliegt, um einen möglichen funktionellen Einfluss dieser Variante auf das Verhalten des Rezeptors aufzudecken.

Tabelle 9 *EGFR-Sequenzanalyse in HNSCC-Zelllinien*

Untersuchte Zelllinie	Veränderung in der Kodon-Sequenz	Kodon-Nr.	Resultierende Aminosäure-Sequenz
UM-SCC-1	ACT→AAT	134	N=N
UM-SCC-3	-	-	-
UM-SCC-4	-	-	-
UM-SCC-14A	AAC→AAT	134	N=N
	AGG→AAG	497	R→K
	ACT→ACA	605	T=T
UM-SCC-22B	CAG→CAA	763	Q=Q
UM-SCC-27	AAC→AAT	134	N=N
	AGG→AAG	497	R→K
	ACT→ACA	605	T=T
UMB-SCC-745	AAC→AAT	134	N=N
UMB-SCC-864	ACT→ACA	605	T=T
	ACC→ACT	879	T=T
UMB-SCC-969	AAC→AAT	134	N=N
	AGG→AAG	497	R→K
	ACT→ACA	605	T=T
UT-SCC-24A	AGG→AAG	497	R→K
	CAG→CAA	763	Q=Q
UT-SCC-26A	-	-	-

4.2 Zellzyklus- und Western Blot-Untersuchungen bei den EGFR-Varianten

Um Unterschiede der EGFR-Varianten im Ansprechen auf Liganden-Stimulation oder Inhibitoren zu analysieren, wurde eine Zellzyklus- und Western Blot-Untersuchung der elf Zelllinien nach TGF- α -Stimulation und Inkubation mit zwei verschiedenen Inhibitoren durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse lassen sich wie folgt zusammenfassen.

4.2.1 Einfluss einer TGF- α -Stimulation

FACS-Analyse: Bei einer Stimulation der Zelllinien mit dem häufig in HNSCC-Tumoren autokrin exprimierten Liganden TGF- α wiesen die Zelllinien der R497-Variante durchschnittlich eine höhere Zahl an Zellen in der G0/G1-Phase bei geringerer Anzahl an Zellen in der S-Phase auf (Abbildung 4.1 b, d blau dargestellt). Im Gegensatz zur R497-Gruppe zeigten Zelllinien der K497-Gruppe (in Abbildung 4.1 rot dargestellt)

eine durchschnittlich höhere Anzahl von Zellen in der S-Phase und eine niedrigere Anzahl in der G0/G1-Phase. Histogramme der FACS-Analyse finden sich im Anhang (8.2).

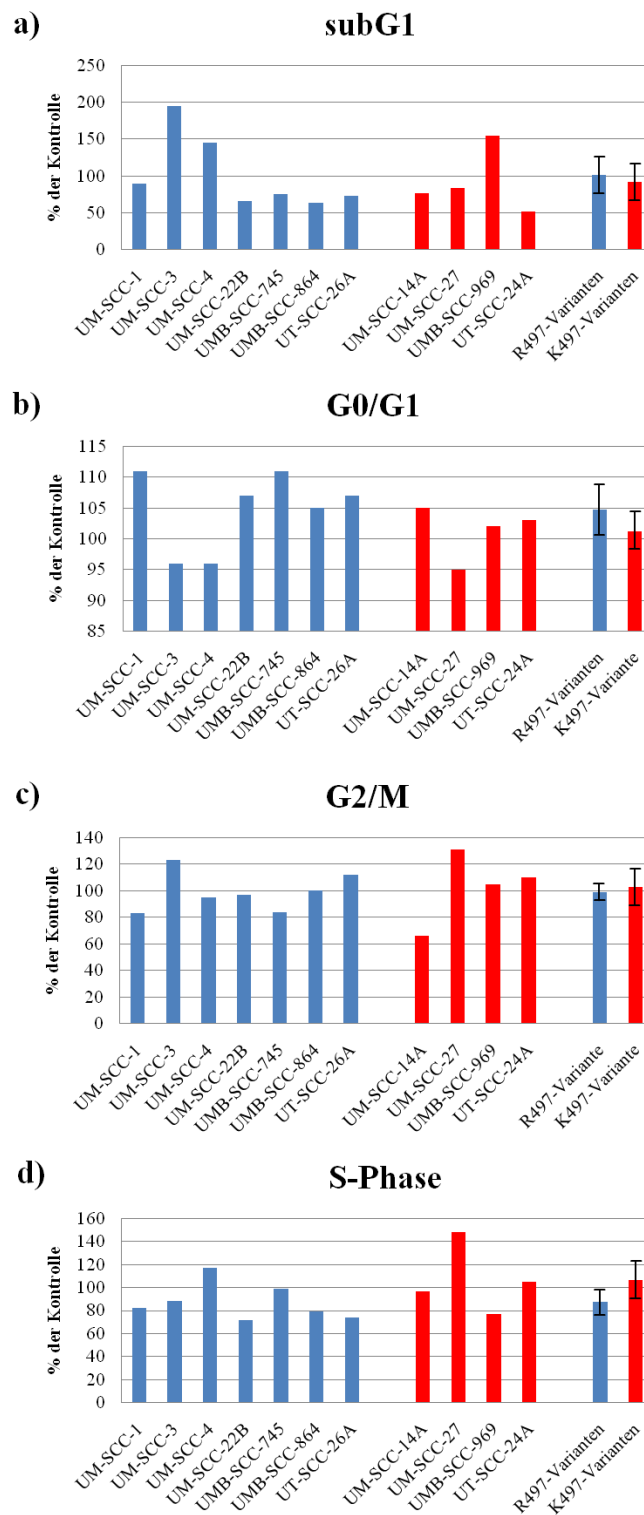


Abbildung 4.1 Einfluss einer TGF- α -Stimulation auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten. Unbehandelte Zelllinien dienten als Kontrolle. Zelllinien der R497-Variante sind blau abgebildet, Zelllinien der K497-Variante rot. Rechts im Diagramm sind jeweils Durchschnittswerte beider EGFR-Varianten dargestellt.

Western Blot-Analyse: Um zu untersuchen, ob HNSCC-Zelllinien und insbesondere beide EGFR-Varianten Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem autokrin exprimierten Liganden TGF- α aufweisen, wurden alle elf Zelllinien mit steigenden TGF- α -Konzentrationen inkubiert und eine Western Blot-Analyse mittels EGFR-spezifischer Antikörper durchgeführt.

Unter TGF- α -Stimulation konnte in sieben der elf Zelllinien (UM-SCC-3, -4, -14A, -22B, UMB-SCC-745, -864, UT-SCC-26A) kein Anstieg der Rezeptor- oder Erk-Phosphorylierung bei starker Grundphosphorylierung beobachtet werden. Vier der elf Zelllinien (UM-SCC-1, -27, UMB-SCC-969, UT-SCC-24A) wiesen unter TGF- α -Konzentrationen bis 1ng/ml einen leichten Anstieg der EGFR- und Erk-Aktivität auf (Abbildung 4.2 a, i, j, h).

Eine Überstimulation des Rezeptors mit hohen TGF- α -Konzentrationen führte in acht der elf Zelllinien (UM-SCC-1, -3, -14A, -22B, -27, UMB-SCC-745, -969, UT-SCC-24A) zu einer Reduktion der EGFR- und Erk-Phosphorylierung (Abbildung 4.2 a, b, d, e, h, i, j, k). Dabei konnte bei den Zelllinien UM-SCC-1,-3, UMB-SCC-745, -969 und UT-SCC-24A eine solche Phosphorylierungsreduktion bei 100 ng/ml, bei den Zelllinien UM-SCC-14A, -22B und -27 bereits bei 10 ng/ml beobachtet werden.

Ein besonders deutlicher Effekt des Liganden konnte in UM-SCC-3, UM-SCC-14A, UM-SCC-22B, UM-SCC-27, UMB-SCC-745 und UMB-SCC-969 dargestellt werden. Hier führte eine hohe TGF- α -Konzentration (100ng/ml) zu einer kompletten Inhibition der Erk-Phosphorylierung.

Die HNSCC-Zelllinien UM-SCC-4, UMB-SCC-969 und UT-SCC-26A exprimierten insgesamt eine geringere Menge des EGF-Rezeptors als die übrigen Zelllinien (Abbildung 4.2 c, g, j). Es konnten keine Sensitivitätsunterschiede zwischen beiden EGFR-Varianten gegenüber TGF- α -Stimulation festgestellt werden.

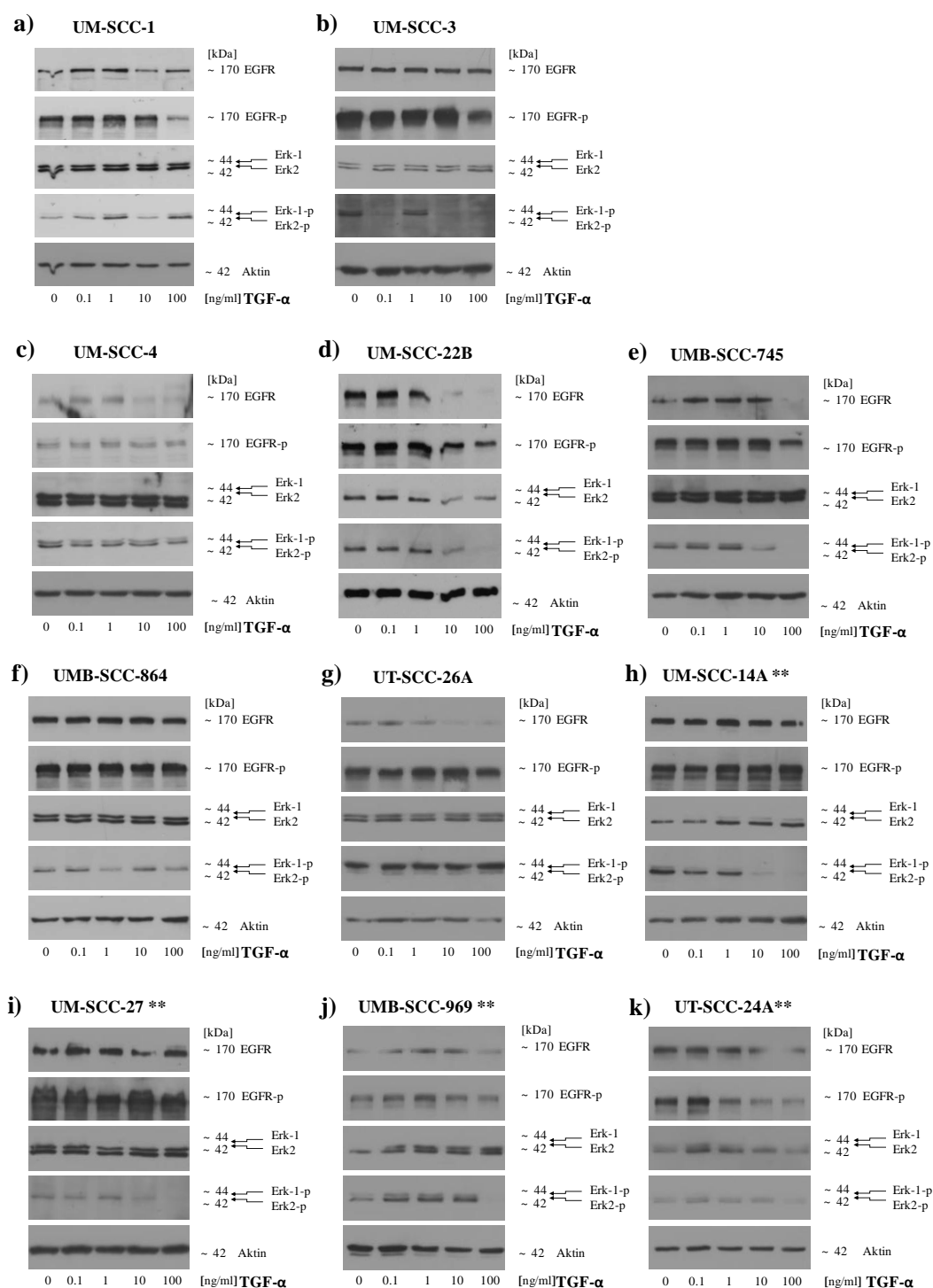


Abbildung 4.2 Western Blot-Analyse von HNSCC-Zelllinien nach Stimulation mit unterschiedlichen TGF- α -Konzentrationen. Zelllinien der K497-Variante sind markiert (**). Die HNSCC-Zelllinien wurden mit steigenden Ligandenkonzentrationen inkubiert. Im Rahmen der Western Blot-Analyse wurden EGFR-spezifische Proteine mit entsprechenden Antikörpern (anti-EGFR, anti-EGFR-p, anti-Erk1/2, anti-Erk-1/2-p) sichtbar gemacht.

4.2.2 Einfluss von AG1478

FACS-Analyse: Unter dem Einfluss des EGFR-spezifischen Kinase-Inhibitors AG1478 kam es zu einem dramatischen Anstieg von Zellen in der subG1-Phase (tote Zellen) und einem gleichzeitigen Abfall der S-Phasen-Population beider EGFR-Varianten (siehe Abbildung 4.3 a, d). Im Gegensatz zur R497-Gruppe zeigten die K497-Zelllinien einen im Durchschnitt höheren Anteil an Zellen der subG1-Phase als die der R497-Gruppe. Histogramme der FACS-Analyse finden sich im Anhang (8.2).

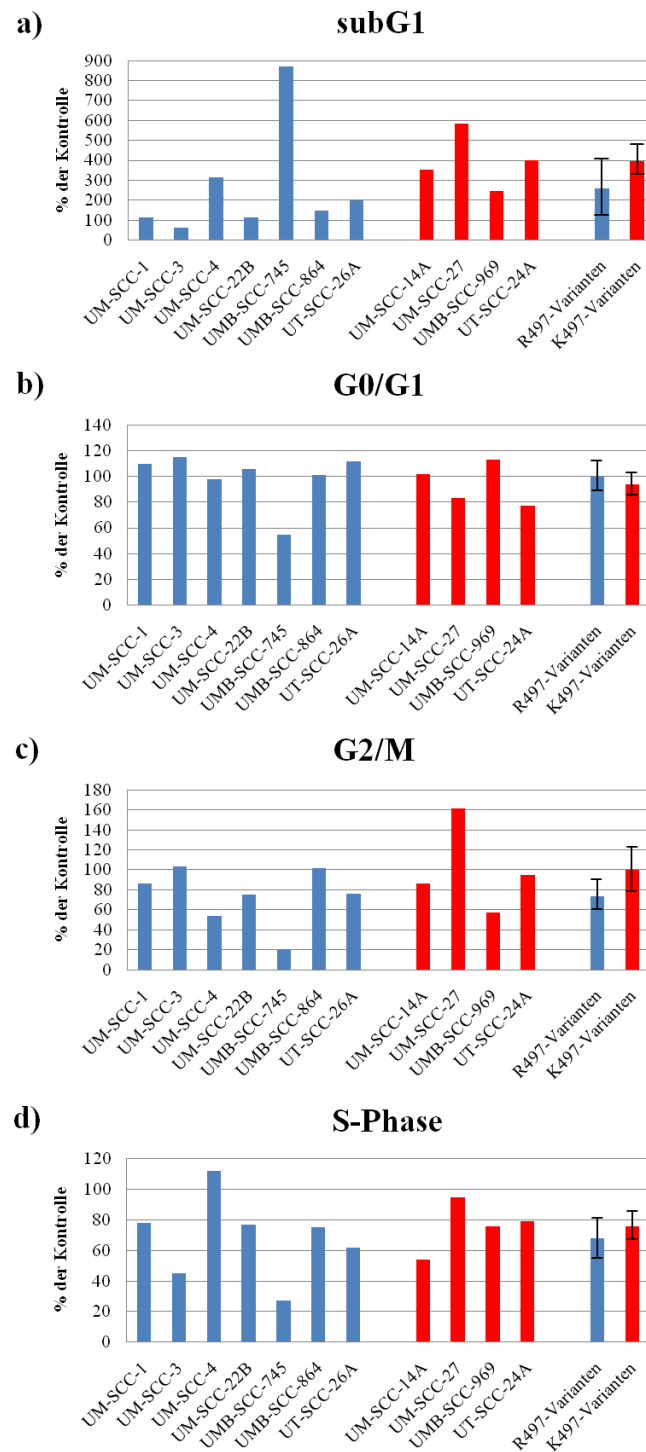


Abbildung 4.3 Einfluss von AG1478 auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten. Unbehandelte Zelllinien dienten als Kontrolle. Zelllinien der R497-Variante sind blau abgebildet, Zelllinien der K497-Variante rot. Rechts im Diagramm sind jeweils Durchschnittswerte beider EGFR-Varianten dargestellt.

Western Blot-Analyse: Um Artefakte durch Überlagerung von Banden während der Western Blot-Analyse ausschließen zu können, wurden die Membranen für jede Zelllinie in doppelter Ausführung angefertigt. Die erste Membran wurde zur Darstellung der EGFR- und Erk-Proteinexpression erstellt. Die zweite Membran sollte die korrespondierenden, phosphorslierten Proteine abbilden. Die entsprechende Ladungskontrollen wurden mittels Aktin durchgeführt und finden sich daher in doppelter Ausführung in den Abbildungen 4.4 und 4.6. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Bei allen elf Zelllinien konnte unter AG1478 eine Reduktion der Rezeptor-Phosphorylierung beobachtet werden (Abbildung 4.4). Besonders ausgeprägt konnte diese sowohl in den Zelllinien mit K497-Polymorphismus UM-SCC-14A, -27, -969, UT-SCC-24A als auch den R497-Zelllinien UM-SCC-1 und UT-SCC-26A dargestellt werden. Bei den Zelllinien UMB-SCC-969 und UT-SCC-24A führt die Inkubation mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor in dieser Konzentration sogar zu einer kompletten Inhibition der Rezeptor-Phosphorylierung (Abbildung 4.4 j, k). Die Zelllinien UM-SCC-22B und UMB-SCC-864 wurden hier nur schwach inhibiert.

In sieben der elf Zelllinien (UM-SCC-3, -4, -14A, -22B, -27, UMB-SCC-745, -969) zeigte sich eine gleichzeitige Reduktion der Erk-Phosphorylierung. UM-SCC-22B, -27, UMB-SCC-745 und -969 sprachen besonders deutlich auf eine Hemmung mit AG1478 an. In den Zelllinien UM-SCC-27 und UMB-SCC-745 führte der Inhibitor in dieser Konzentration darüber hinaus zu einer kompletten Inhibition der Erk-Phosphorylierung (Abbildung 4.4 e, i). UMB-SCC-864 und UT-SCC-26A wiesen unter AG1478 überraschenderweise einen Anstieg der Erk-Phosphorylierung auf (Abbildung 4.4 f, g).

Der EGFR-spezifische Inhibitor AG1478 führte bei einer Konzentration von 10µg/ml weder zu einer merklichen Veränderung der Rezeptor- noch der Erk-Expression.

Zelllinien der K497-Variante schienen keine Unterschiede im Ansprechen auf den EGFR-spezifischen Inhibitor im Vergleich zur R497-Variante aufzuweisen.

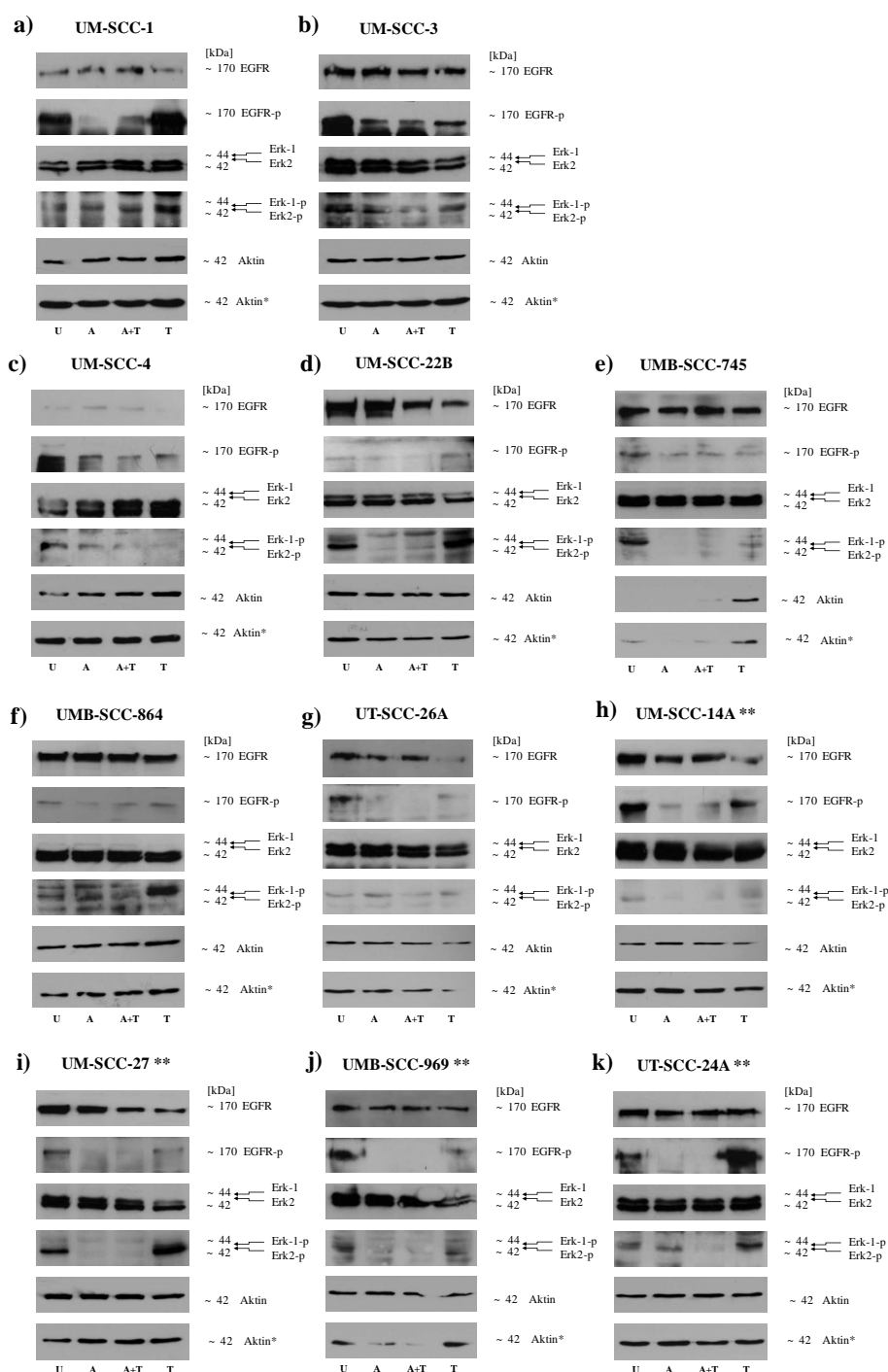


Abbildung 4.4 Western Blot-Analyse des Einflusses von AG1478 auf Rezeptoraktivität und EGFR-abhängige Signalvermittlung der elf HNSC-Zelllinien mit Aktin als Ladungskontrollen. Die HNSCC-Zelllinien wurden dabei jeweils mit dem Inhibitor allein (A), mit dem Liganden allein (T) sowie dem Inhibitor unter Ligandenstimulation (A+T) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (U). Im Rahmen der Western Blot-Analyse wurden EGFR-spezifische Proteine mit entsprechenden Antikörpern (anti-EGFR, anti-EGFR-p, anti-Erk1/2, anti-Erk-1/2-p) sichtbar gemacht. Aktin stellte dabei, wie oben beschrieben, die Ladungskontrolle zu EGFR und Erk dar. Aktin* wurde als Kontrolle zu EGFR-p und Erk-p verwendet. Die K497-Zelllinien sind markiert (**).

4.2.3 Einfluss von Cetuximab

FACS-Analyse: Nach Inkubation mit dem monoklonalen anti-EGFR-Antikörper Cetuximab konnte ein deutlicher Anstieg der Zellen in der subG1-Phase (tote Zellen) und ein Abfall der Zellzahl innerhalb der S-Phase beobachtet werden (Abbildung 4.5 a, d). Ähnlich wie bei AG1478 zeigte ein Vergleich beider EGFR-Varianten bei der K497-Gruppe durchschnittlich einen höheren Zellanteil innerhalb der subG1-Population. Histogramme der FACS-Analyse finden sich im Anhang (8.2).

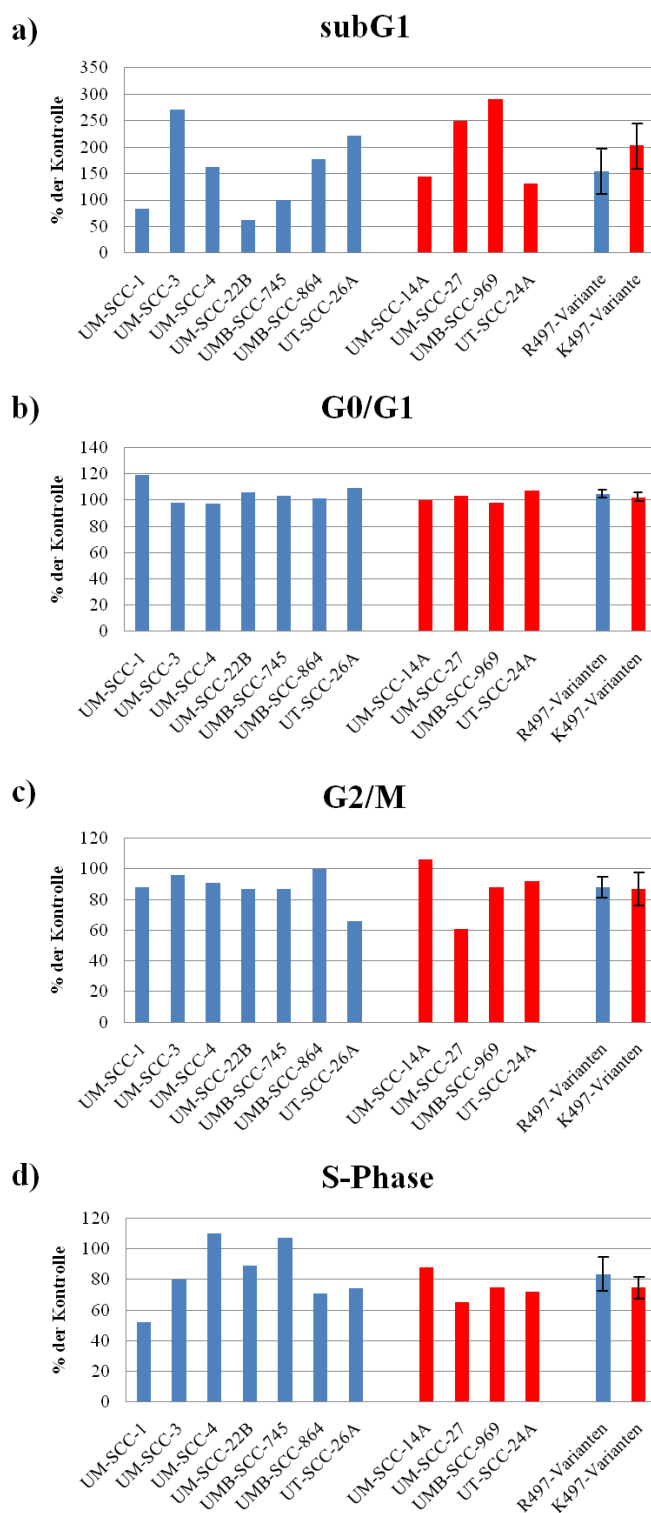


Abbildung 4.5 Einfluss von Cetuximab auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten. Unbehandelte Zelllinien dienen als Kontrolle. Zelllinien der R497-Variante sind blau abgebildet, Zelllinien der K497-Variante rot. Rechts im Diagramm sind jeweils Durchschnittswerte beider EGFR-Varianten dargestellt.

Western Blot-Analyse: Überraschender Weise zeigte sich unter dem Einfluss von Cetuximab in sechs der elf untersuchten Zelllinien (UM-SCC-1, -3, -27, UMB-SCC-745, -864, UT-SCC-24A) eine Hyperphosphorylierung des EGF-Rezeptors (siehe Abbildung 4.6 a, b, e, f, i, k). In nur drei der elf Zelllinien, UM-SCC-14A, UMB-SCC-969 und UT-SCC-26A, führte Cetuximab zu einer verminderten Rezeptorphosphorylierung. Die Phosphorylierung des EGFRs in UM-SCC-4 und -22B blieb unter Cetuximab-Behandlung unbeeinflusst. In fünf von elf Zelllinien (UM-SCC1, -14A, -27, UMB-SCC-745, -969) wurde eine Verringerung der Erk-Phosphorylierung beobachtet. Trotz einer scheinbar gesteigerten EGFR-Phosphorylierung zählten hierzu auch drei der hyperphosphorylierten Zelllinien (UM-SCC-1, -27, UMB-SCC-745). Es zeigte sich eine besonders deutliche Verminderung der Erk-Phosphorylierung in UMB-SCC-745 und UMB-SCC-969 (Abbildung 4.6 e, j), während eine nur schwache Reduktion innerhalb von UM-SCC-1, UM-SCC-27 und UT-SCC-26A beobachtet werden konnte. Somit wiesen nur die Zelllinien UM-SCC-14A und UMB-SCC-969 sowohl eine reduzierte EGFR- als auch Erk-Phosphorylierung auf (Abbildung 4.6 h, j), während die übrigen Zelllinien unter dem Einfluss von Cetuximab eine unveränderte Erk-Phosphorylierung aufzeigten.

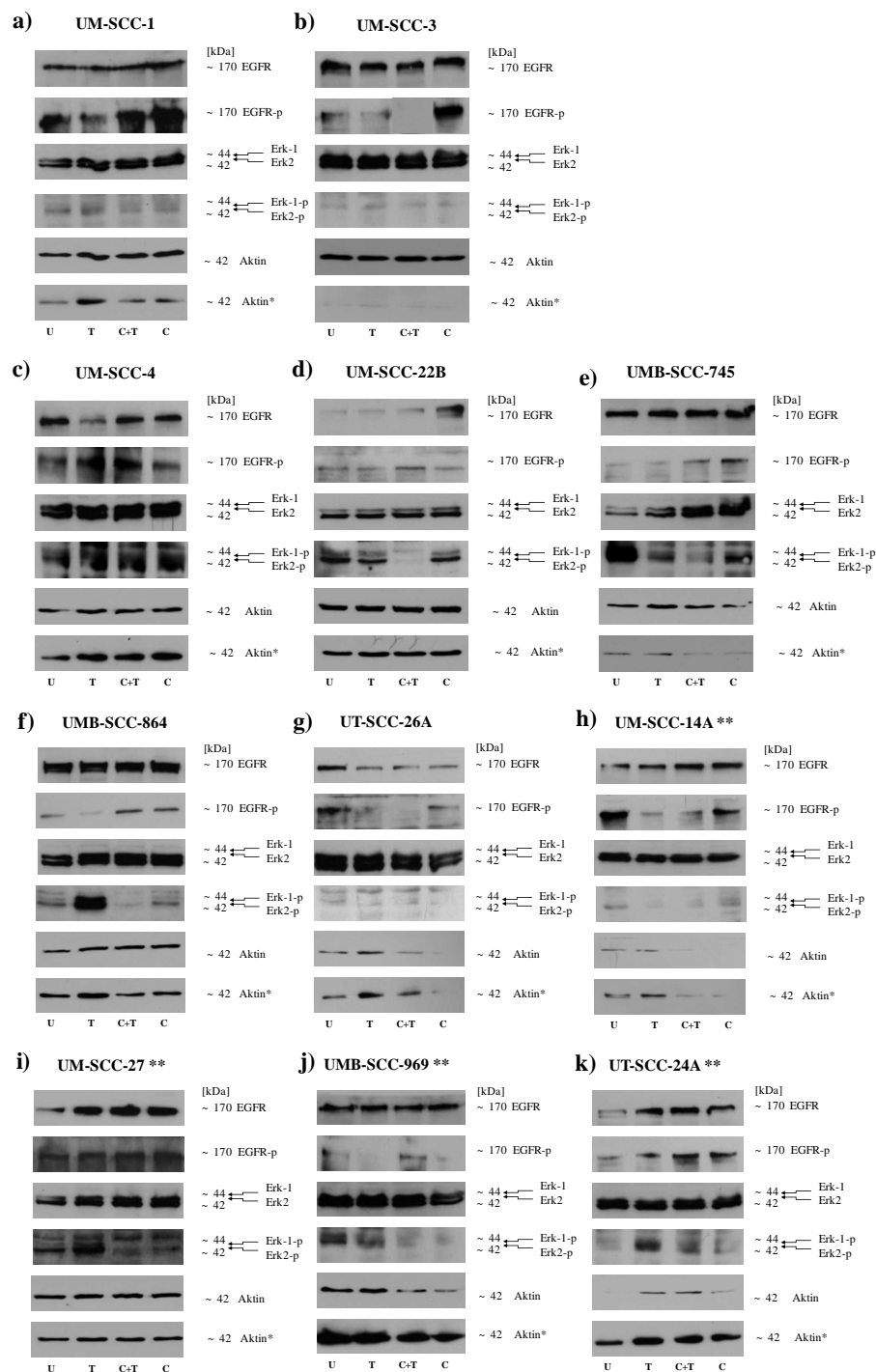


Abbildung 4.6 Western Blot-Analyse des Einflusses von Cetuximab auf Rezeptoraktivität und EGFR-abhängige Signalvermittlung der elf HNSCC-Zelllinien mit Aktin als Ladungskontrollen. Die HNSCC-Zelllinien wurden dabei jeweils mit dem Inhibitor allein (C), mit dem Liganden allein (T) sowie dem Inhibitor unter Ligandenstimulation (C+T) inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (U). Im Rahmen der Western Blot-Analyse wurden EGFR-spezifische Proteine mit entsprechenden Antikörpern (anti-EGFR, anti-EGFR-p, anti-Erk1/2, anti-Erk-1/2-p) sichtbar gemacht. Aktin stellte dabei, wie oben beschrieben, die Ladungskontrolle zu EGFR und Erk dar. Aktin* wurde als Kontrolle zu EGFR-p und Erk-p verwendet. Die K497-Zelllinien sind markiert (**).

4.2.4 Einfluss von AG1478 bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF- α

FACS-Analyse: Eine Inhibition mit AG1478 bei einer gleichzeitigen Stimulation der Zelllinien mit TGF- α führte bei den untersuchten Zelllinien zu keiner wesentlichen Veränderung der Wirkung von AG1478 (Abbildung 4.7). Es konnten keine Unterschiede im Ansprechen der beiden EGFR-Gruppen beobachtet werden. Histogramme der FACS-Analysen sind im Anhang abgebildet (8.2).

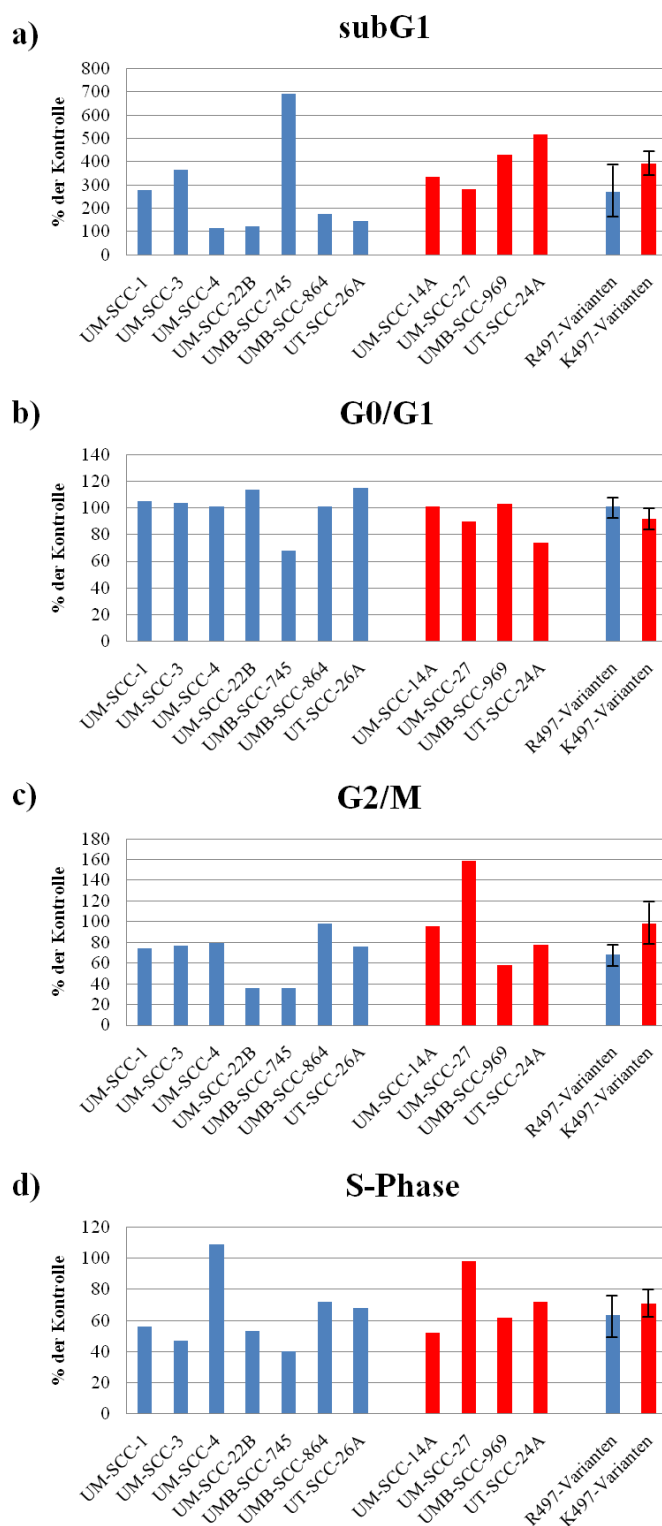


Abbildung 4.7 Einfluss von AG1478 auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten bei gleichzeitiger TGF- α -Stimulation. Unbehandelte Zelllinien dienen als Kontrolle. Zelllinien der R497-Variante sind blau abgebildet, Zelllinien der K497-Variante rot. Rechts im Diagramm sind jeweils Durchschnittswerte beider EGFR-Varianten dargestellt.

Western Blot-Analyse: Die Behandlung der HNSCC-Zelllinien mit AG1478 bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF- α führte bei keiner der elf Zelllinien zu einem verstärkten Effekt des Inhibitors auf die EGFR-Aktivität (siehe Abbildung 4.4). In neun der elf Zelllinien (UM-SCC-3, -4, -22B, -27, UMB-SCC-745, -864, -969, UT-SCC-24A, -26A) kam es zu einer unveränderten Auswirkung des Inhibitors auf die EGFR-Phosphorylierung (siehe Abbildung 4.4). Nur die Zelllinien UM-SCC-1 und -14A wiesen im Vergleich zum Inhibitor eine etwas höhere EGFR-Phosphorylierung auf. Die Zelllinien UM-SCC-3, UMB-SCC-864 und UT-SCC-26A zeigten eine leicht verstärkte, UM-SCC-22B und UT-SCC-24A eine leicht verminderte Inhibition der Erk-Phosphorylierung (Abbildung 4.4 b, f, g und d, k). Es wurde kein Effekt auf die EGFR- oder Erk-Expression beobachtet. Ein Vergleich der beiden EGFR-Varianten zeigte keine Unterschiede im Ansprechen der Polymorphismus-Gruppen.

4.2.5 Einfluss von Cetuximab bei TGF- α -Stimulation

FACS-Analyse: Eine gleichzeitige Inkubation der Zelllinien mit dem Inhibitor Cetuximab und einer Stimulation der Zelllinien mit TGF- α führte bei den Zelllinien der K497-Variante zu einer verminderten Anzahl der subG1-Zellen bei einem gleichzeitigen Anstieg der Zellzahl der S-Phase (Abbildung 4.8 a, c). Der Effekt des monoklonalen Antikörpers blieb bei den Zelllinien der R497-Variante unbeeinflusst. Histogramme der FACS-Analyse finden sich im Anhang (8.2).

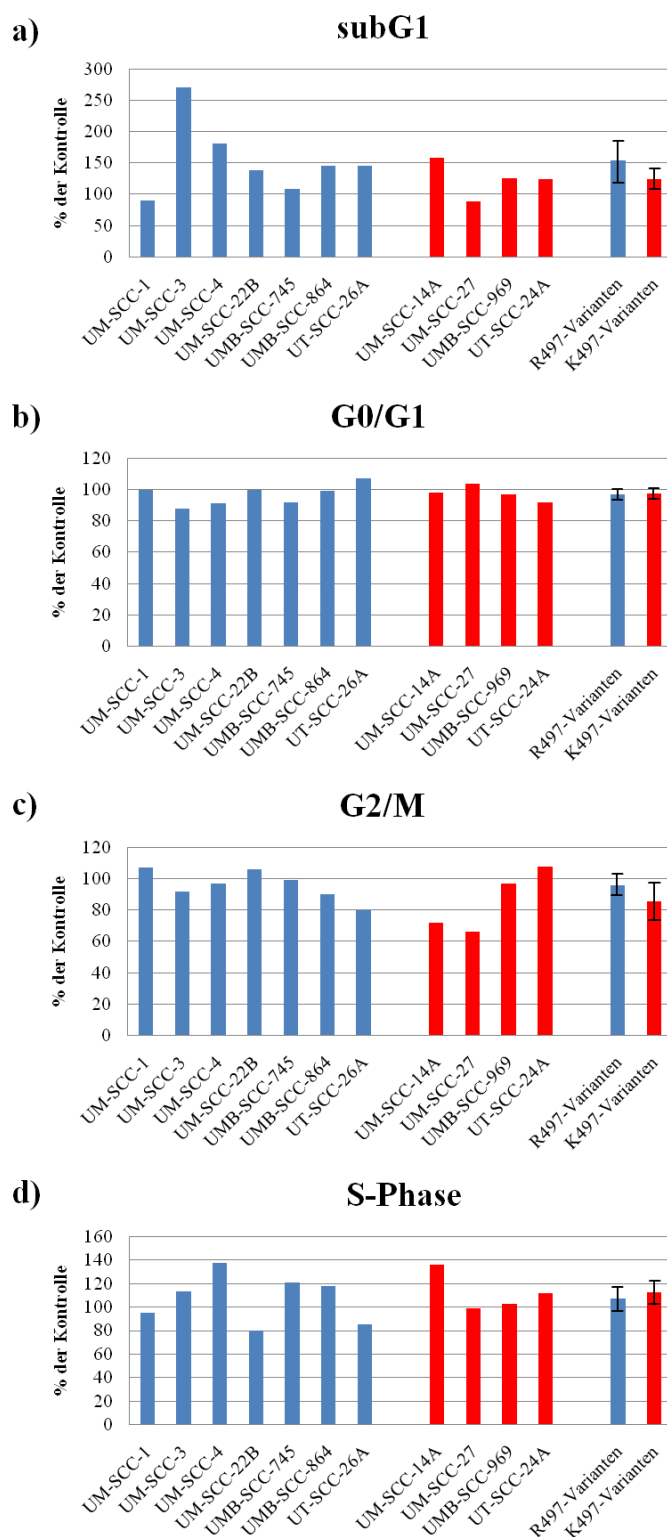


Abbildung 4.8 Einfluss von Cetuximab auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten bei gleichzeitiger TGF- α -Stimulation. Unbehandelte Zelllinien dienen als Kontrolle. Zelllinien der R497-Variante sind blau abgebildet, Zelllinien der K497-Variante rot. Rechts im Diagramm sind jeweils Durchschnittswerte beider EGFR-Varianten dargestellt.

Western Blot-Analyse: Insgesamt bewirkte die zeitgleiche Behandlung der Zelllinien mit Cetuximab und TGF- α bei der Zelllinie UMB-SCC-745 sowohl eine Reduktion der EGFR- als auch der Erk-Phosphorylierung (Abbildung 4.6 e). Bei der Zelllinie UT-SCC-24A konnte sowohl eine Verminderung des Cetuximab-Effekts bezüglich der EGFR- als auch der Erk-Phosphorylierung beobachtet werden. Es wurde sowohl eine vermehrte EGFR- als auch Erk-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abbildung 4.6 k). Bei vier der elf Zelllinien (UM-SC-1, -3, -14A, UT-SCC-26A) führten Cetuximab und TGF- α allein zu einer Verstärkung des inhibitorischen Effekts auf die EGFR-Phosphorylierung. Dabei wiesen zwei dieser Zelllinien (UM-SCC-1, -3), die unter Cetuximab allein eine Hyperphosphorylierung zeigten, unter gleichzeitiger TGF- α -Stimulation und Cetuximab-Inhibition eine Verringerung des Phosphorylierungsniveaus des Rezeptors auf. Die Zelllinie UM-SCC-3 zeigte sogar eine komplette Inhibition der Rezeptorphosphorylierung (Abbildung 4.6 b), während UM-SCC-1 zwar eine leichte Verringerung des Phosphorylierungsgrades, jedoch noch immer deutlich hyperphosphoryliert erschien. Die drei unter Cetuximab allein ebenfalls hyperphosphorylierten Zelllinien UM-SCC-27, UMB-SCC-864 und UT-SCC-24A wiesen unter zeitgleicher Stimulation eine unverändert starke Rezeptorphosphorylierung auf. Bei den Zelllinien UM-SCC-4 und UMB-SC-969 konnte eine Verminderung des hemmenden Cetuximab-Effekts auf die EGFR-Phosphorylierung beobachtet werden.

UMB-SCC-864 wies nur eine verminderte Erk-Phosphorylierung auf. UM-SCC-22B reagierte auf die gleichzeitige Inkubation mit Ligand und Inhibitor zwar mit einer Steigerung der EGFR-, jedoch mit einem Abfall der Erk-Phosphorylierung.

UM-SCC-27 zeigte weder einen veränderten Effekt des Inhibitors auf die EGFR- noch auf die Erk-Phosphorylierung unter TGF- α -Stimulation. Die EGFR- und Erk-Expression schien unverändert. Es konnten keine Unterschiede der beiden EGFR-Varianten bezüglich ihrer Sensitivität festgestellt werden.

4.3 Immunzytochemische Darstellung von EGFR in den untersuchten HNSCC-Zelllinien

Anhand einer immunzytochemischen Färbung wurden die elf Zelllinien auf Unterschiede in der Expression des EGF-Rezeptors auf ihrer Zelloberfläche untersucht.

Hierbei sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine Überexpression des EGFRs auch bei diesen elf HNSCC-Zelllinien vorliegt. Zudem wurde untersucht, ob beide EGFR-Varianten Unterschiede in der EGFR-Expression oder der subzellulären Lokalisation aufweisen. Gleichzeitig wurde das zelluläre Verteilungsmuster des Rezeptors unter Stimulation mit TGF- α analysiert, was Rückschlüsse auf eine normale Inaktivierung des Rezeptors durch Internalisierung und Degradation in den Lysosomen oder eine eventuelles Abweichen davon ermöglichen sollte.

Dabei konnte bei den Zelllinien UM-SCC-1, -3, -14A, -22B, UMB-SCC-864, -969, UT-SCC-24A und -26A eine ausschließlich membranäre Expression des EGF-Rezeptors dargestellt werden. UM-SCC-4 wies in Abwesenheit von exogen zugeführten Liganden einen deutlichen Anteil an intrazellulär lokalisiertem Rezeptor bei schwacher membranärer Färbung auf. In den Zelllinien UM-SCC-27 und UMB-SCC-745 konnte ausschließlich eine intrazelluläre Lokalisation dargestellt werden.

Unter TGF- α -Stimulation ließ sich eine allmähliche Reduktion der auf der Oberfläche exprimierten Rezeptoren und ein zunehmend granuläres Verteilungsmuster innerhalb des Zytoplasmas beobachten. Hierbei konnte innerhalb der Zelllinien, die den Rezeptor auf der Zellmembran exprimierten (UM-SCC-1, -3, -4, -14A, -22B, UMB-SCC-864, -969, UT-SCC-24A, -26A) unter TGF- α eine Reduktion der auf der Oberfläche lokalisierten Rezeptoren bei gleichzeitiger Färbung vesikulärer Strukturen im Zytoplasma beobachtet werden. Bei den Zelllinien UM-SCC-27 und UMB-SCC-745, die in unbehandelter Form eine ausschließlich zytoplasmatische Färbung aufwiesen, konnte unter TGF- α -Einfluss eine Verminderung der Färbungsintensität des Zytoplasmas bei gleichzeitig zunehmender Färbung vesikulärer Formationen dargestellt werden. Bei einer Überstimulation der Zelllinien mit 100ng/ml TGF- α konnte in neun der elf Zelllinien eine vollständige Internalisierung und zunehmende Degradation der Rezeptoren beobachtet werden. UM-SCC-14A und -22B wiesen hingegen noch eine verbliebene Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche auf. Unterschiede zwischen den K497- und den R497-Zelllinien konnten nicht beobachtet werden.

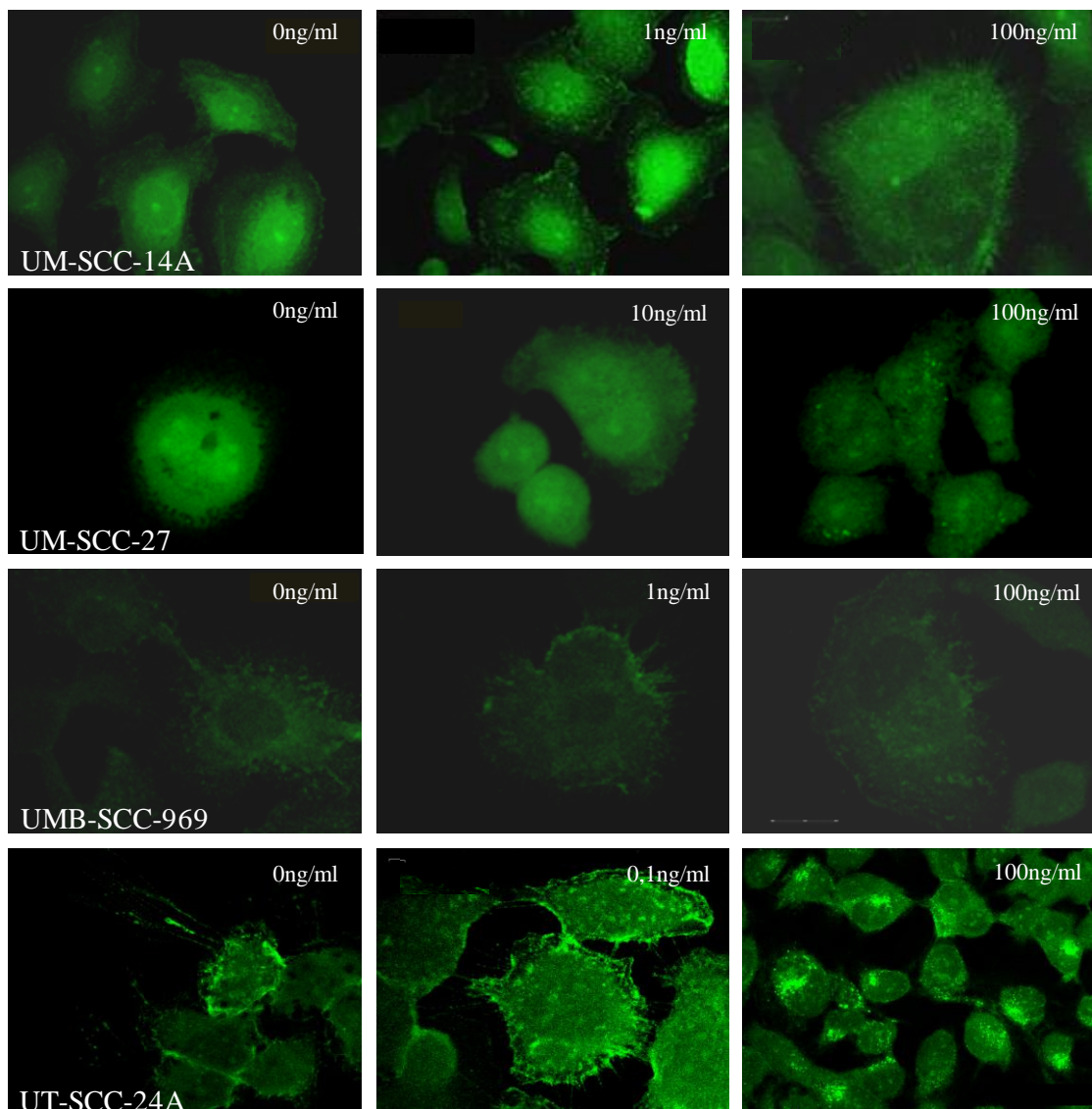


Abbildung 4.9 Immunzytochemische Untersuchung der elf Zelllinien auf Änderungen in der subzellulären Lokalisation von EGFR nach TGF- α -Stimulation bei Zelllinien der K497-Variante

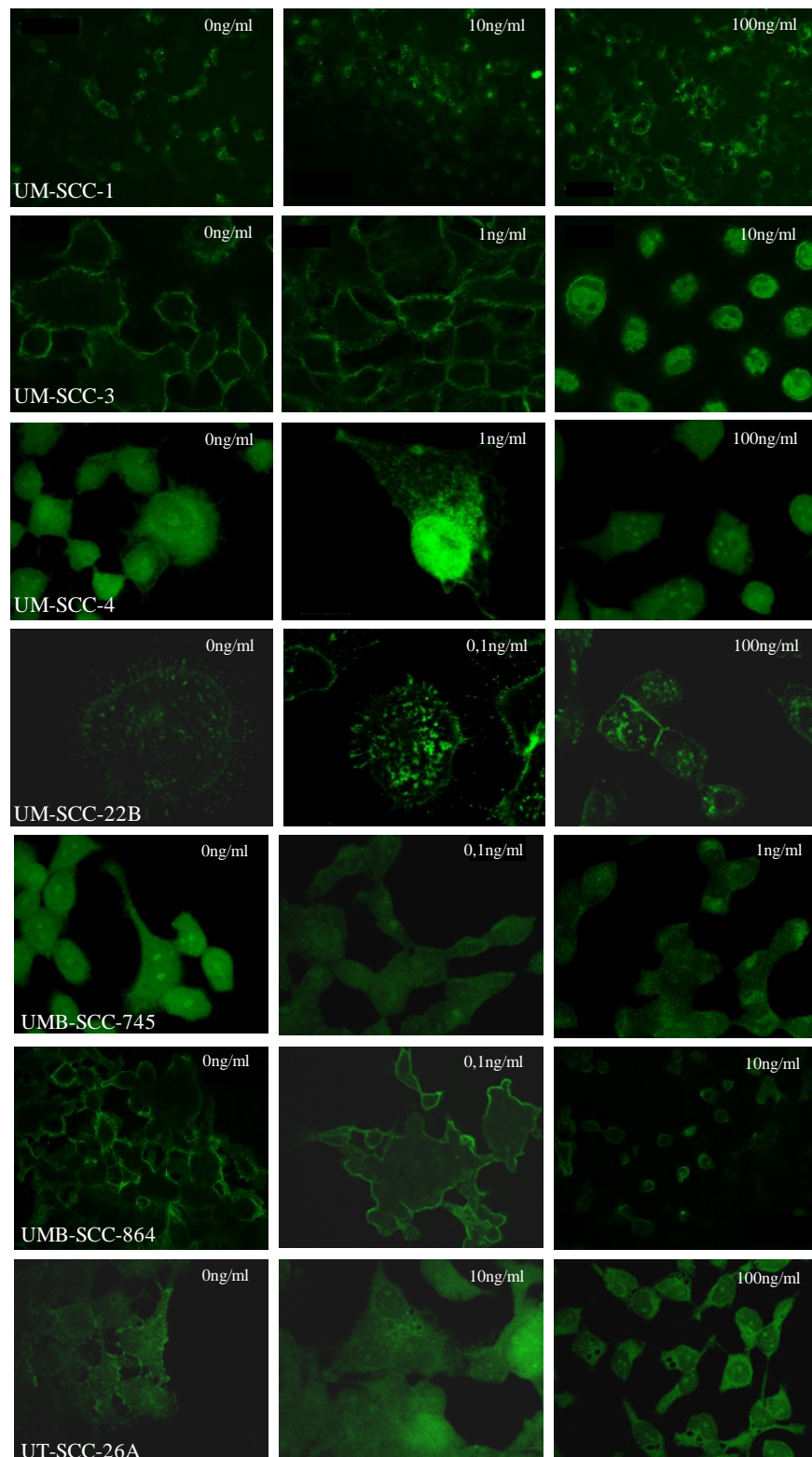


Abbildung 4.10 Immunzytochemische Untersuchung der elf Zelllinien auf Änderungen in der subzellulären Lokalisation von EGFR nach TGF- α -Stimulation bei Zelllinien der R497-Variante.

4.3 Untersuchung auf autokrine Expression des Liganden TGF- α

Anhand immunzytochemischer Untersuchungen sollten HNSCC-Zelllinien auf eine autokrine TGF- α -Expression hin untersucht werden. Gleichzeitig wurden beide EGFR-Varianten auch im Hinblick auf Unterschiede in der TGF- α -Expression begutachtet. Die elf Zelllinien zeigten dabei eine vorwiegend zytoplasmatische, jedoch keine membranäre Färbung der Zellen. Es konnten Unterschiede im Verteilungsmuster beobachtet werden. Neun der elf Zelllinien (UM-SCC-3, -4, -14A, -22B, -27, UMB-SCC-745, -864, -969 und UT-SCC-24A) besaßen ein granuläres Verteilungsmuster. Die übrigen Zelllinien, UM-SCC-1 und UT-SCC-26A, ließen ein homogenes Verteilungsmuster erkennen. Hierbei waren keine wesentlichen Unterschiede bei beiden EGFR-Gruppen bezüglich der Expression des autokrinen Liganden nachweisbar.

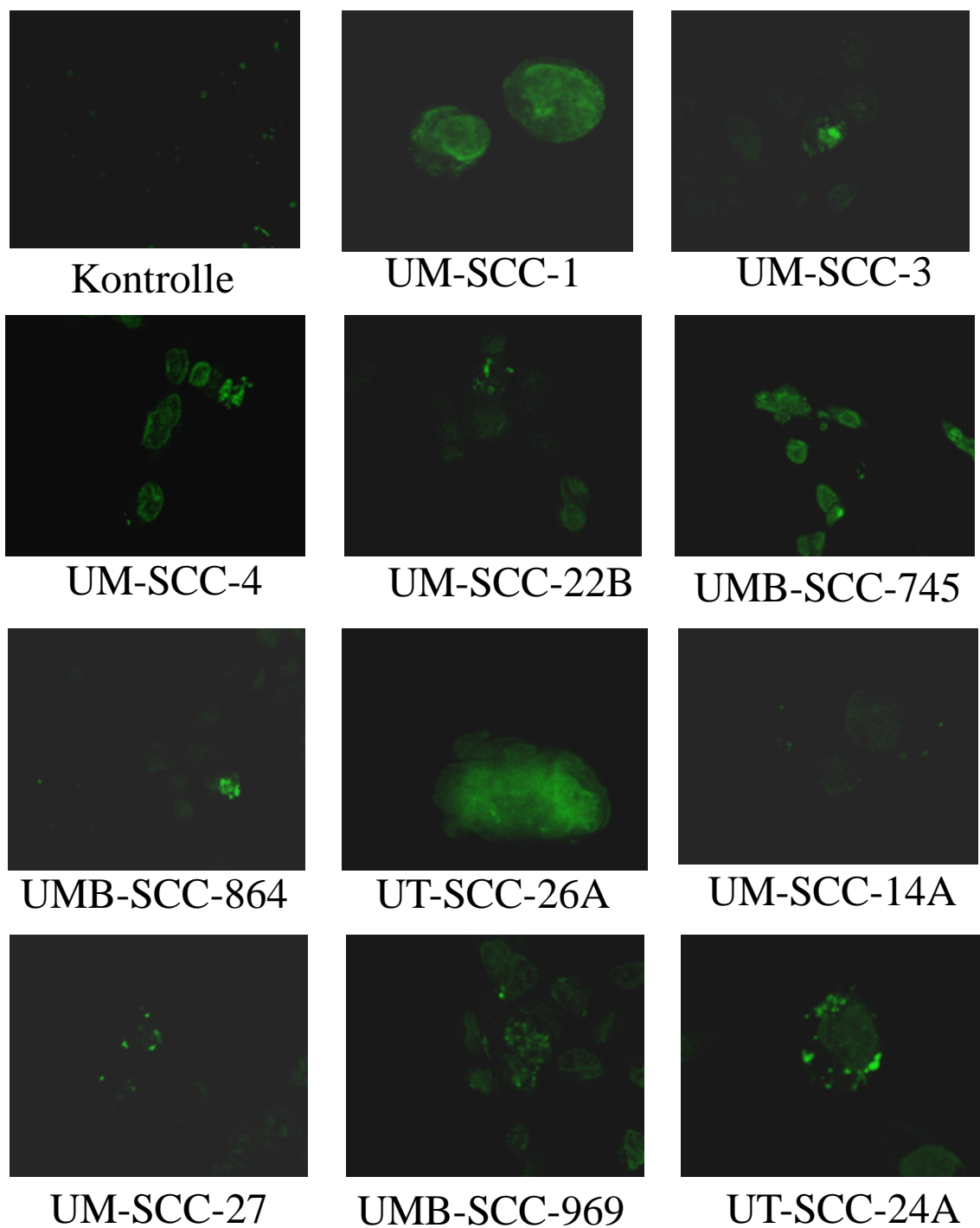


Abbildung 4.11 Immunzytochemische Untersuchung der elf HNSCC-Zelllinien auf autokrine TGF- α -Expression mit einem typischen Beispiel einer Kontrolle.

4.4 Auswirkungen von TGF- α auf die Aktin-Expression

Zur internen Kontrolle der Proteinkonzentration in den Geltaschen wurde ein anti-Aktin-Antikörper verwendet. In dieser Arbeit wurden zum Ausschluss von Artefakten durch Überlagerung von Banden für jede Zelllinie zwei gleiche Membranen, zum einen zur Darstellung von EGFR und Erk, zum anderen zur Darstellung der korrespondierenden phosphorylierten Proteine angefertigt. Die entsprechenden Ladungskontrollen wurden mittels Aktin durchgeführt und finden sich daher in den Abbildungen 4.4 und 4.6 in doppelter Ausführung.

Im Rahmen dieser Aktin-Kontrollen konnte unter TGF- α -Einfluss in vier der elf untersuchten Zelllinien eine in beiden Ladungskontrollen verstärkte Expression des Proteins beobachtet werden. Hiervon waren die Zelllinien UM-SCC-1, -4, UMB-SCC-745 und -864 betroffen.

4.5 Invasions-Assay

Um zu prüfen, ob die unter TGF- α erhöhte Aktin-Expression mit einer gesteigerten Invasivität der Zellen assoziiert ist, wurden die betroffenen Zelllinien nach TGF- α -Stimulation mittels Invasions-Assay untersucht. Als Kontrolle dienten sowohl MDCK-C7-Zellen, als auch unstimulierte Zellen der entsprechenden Zelllinie (Abbildung 4.12).

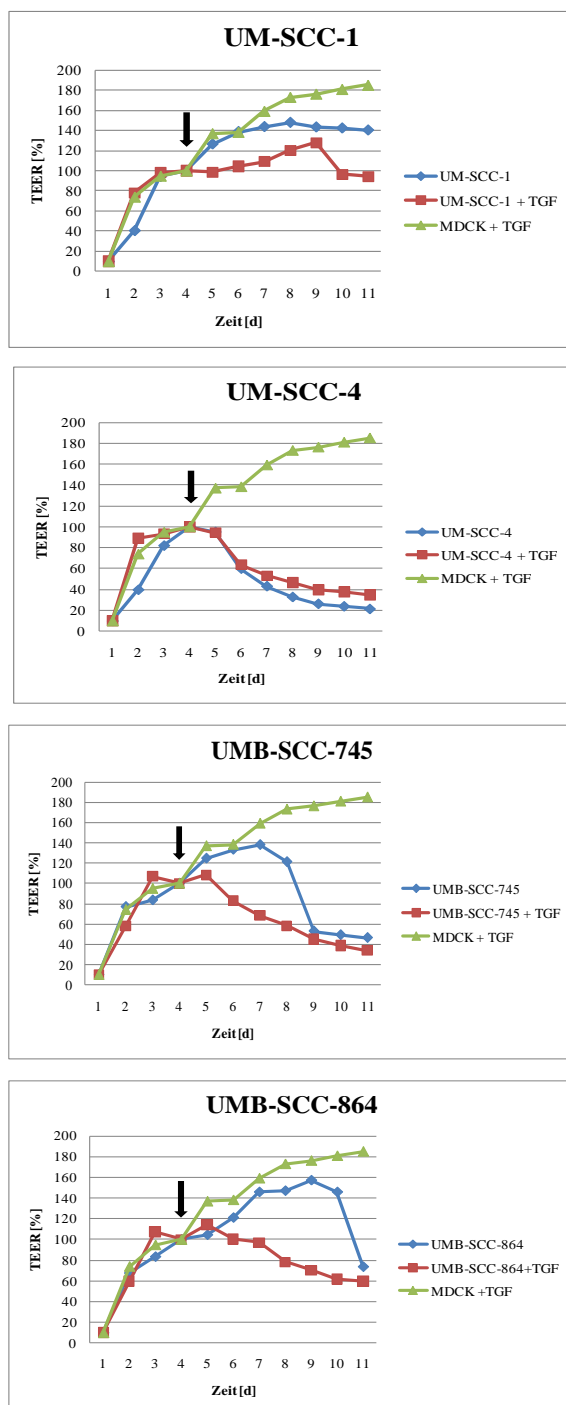
UM-SCC-1: Die Zelllinie UM-SCC-1 zeigte im Vergleich zur MDCK-C7-Kontrolle weder unstimuliert noch stimuliert eine gesteigerte Invasivität.

UM-SCC-4: UM-SCC-4 wies im Vergleich zu den Kontrollzellen sowohl in unstimuliertem als auch stimuliertem Zustand ein vermehrt invasives Verhalten auf.

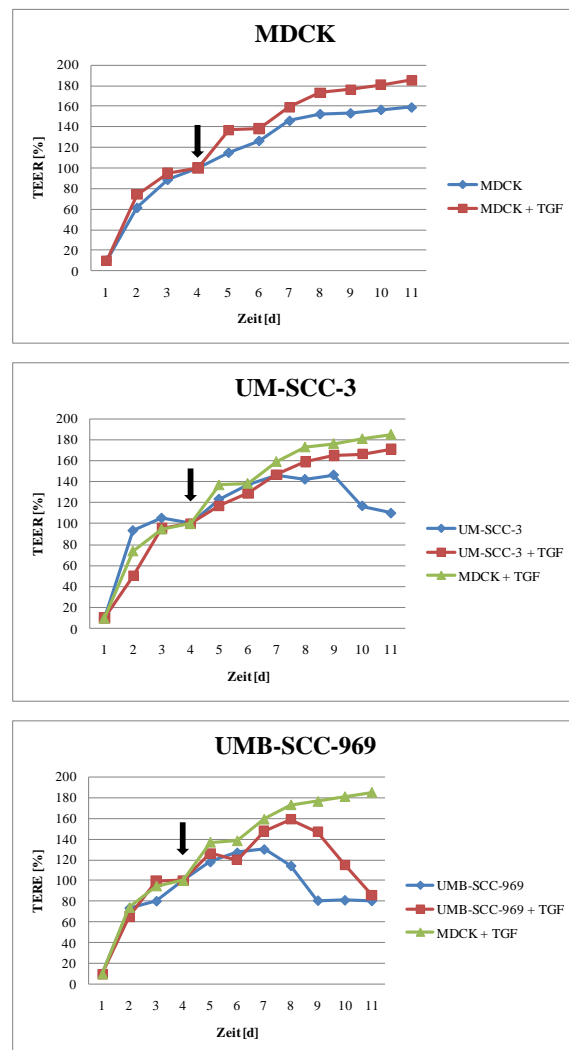
UMB-SCC-745: Zellen der Zelllinie UMB-SCC-745 ließen im Vergleich zur Kontrolle und zur unbehandelten Form eine gesteigerte Invasivität nach TGF- α -Stimulation beobachten. Sie wiesen bei Stimulation bereits 24 Stunden nach Zugabe der Zellen einen langsamen Abfall des transepithelialen, elektrischen Widerstands (TEER) auf.

UMB-SCC-864: Die Zelllinie UMB-SCC-864 zeigte in unbehandelter Form einen der Kontroll-Zelllinie ähnlichen Kurvenverlauf. TGF- α -behandelte Zellen wiesen eine gesteigerte Invasivität auf.

Aktin erhöht nach TGF- α -Stimulation



Aktin unverändert nach TGF- α -Stimulation



4.12 Untersuchung zur Auswirkung einer TGF- α -Stimulation auf die Invasivität von HNSCC-Zelllinien. Bestimmung des transepithelialen, elektrischen Widerstands (TEER) von MDCK-C7-Zelllinien nach Zugabe von stimulierten (rot) und unstimulierten (blau) Tumorzelllinien mit erhöhter Aktinexpression. MDCK-C7, UM-SCC-3, UMB-SCC-969 dienten dabei als Kontrollzelllinien, da sie keine TGF- α -abhängige Aktin-Erhöhung zeigten. In jedem Diagramm ist in grün der TEER-Verlauf von TGF- α -stimulierten MDCK-Zellen als Kontrolle dargestellt.

5 Diskussion

Plattenepithelkarzinome stellen die häufigste Form der malignen Tumore der oberen Luft- und Speisewege dar [10]. Weltweit repräsentieren sie bereits die sechst häufigste Tumorerkrankung und ihre Inzidenz steigt weiter. In Tumoren der Brust, der Lunge und des Dickdarms ist der EGF-Rezeptor häufig überexprimiert. Eine Überexpression des EGFR konnte in über 90% der HNSCC-Tumoren beschrieben werden [27,48] und scheint ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung zu sein. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der Rezeptor eine zentrale Rolle in der Entstehung von Tumoren spielt. Gleichzeitig konnte in diesen Tumoren eine Überexpression des EGFR-Liganden TGF- α nachgewiesen werden [16]. Diese Überexpression des EGF-Rezeptors in Tumoren von HNSCC-Patienten korreliert mit einem raschen Krankheitsprogress und einer ungünstigen Prognose [5, 6, 23]. Aus diesem Grund ist EGFR häufig Fokus wissenschaftlicher Arbeiten und stellt ein vielversprechendes therapeutisches Ziel dar.

Ein besseres Verständnis der EGFR-abhängigen Signalvermittlung ist nötig, um vorhersagen zu können, ob ein spezielles Patientenkollektiv aufgrund seines EGFR-Status von einer bestimmten anti-EGFR-Therapie profitieren könnte. Die Strategien der Krebstherapie verfolgen dabei das Ziel, die EGFR-Signaltransduktion zu unterbrechen. Zwei Medikamentengruppen der anti-EGFR-Therapie haben sich dabei als besonders wirksam gegen den Progress von HNSCC-Tumoren erwiesen. Zum einen zeigt die Therapie mit monoklonalen Antikörpern, welche die Liganden-Bindungsstelle des EGFRs kompetitiv blockieren, einen wachstumsinhibierenden Effekt; zum anderen werden Tyrosin-Kinase-Inhibitoren verwendet, die durch die kompetitive Blockade der ATP-Bindungsstelle der Kinase eine Autophosphorylierung der katalytischen Domäne des EGFRs verhindern und zu einer Blockade der Signalübertragung führen. Die am weitesten entwickelten Repräsentanten dieser beiden Wirkstoffgruppen stellen der Antikörper Cetuximab und der Tyrosin-Kinase-Inhibitor Gefitinib dar. Interessanter Weise zeigen HNSCC-Tumorzellen jedoch deutliche Unterschiede in ihrer Sensitivität gegenüber diesen Inhibitoren. Die Mechanismen, die einer Sensitivität oder gar einer Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren zu Grunde liegen, sind noch unklar. Bei Patienten mit nichtkleinzelligen Bronchial-Karzinomen konnten sensitivitätssteigernde Mutationen innerhalb der Tyrosin-Kinase-Domäne beobachtet werden, die ein

drastisches Ansprechen der Tumorzellen auf EGFR-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren zur Folge hatten [26]. Diese Sequenzveränderungen konnten in einem Drittel aller Lungentumoren nachgewiesen werden [26, 34]. Alle diese EGFR-Mutationen betrafen Aminosäuren nahe der ATP-Bindungstasche der Tyrosin-Kinase-Domäne, die ein Tyrosin-Kinase-Inhibitor als Ziel besitzt [35]. In einer Studie von Hama et al., welche HNSCC-Tumorzelllinien untersuchte, konnten bereits ebenfalls Mutationen im Bereich des EGFRs beobachtet werden [17].

5.1 EGFR-Sequenzanalyse in HNSCC-Zelllinien

Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches wurde eine deutliche Divergenz im Ansprechen auf eben diese Tyrosin-Kinase-Inhibitoren beobachtet. Daher stellte sich die Frage, ob bei Patienten mit HNSCC-Tumoren, die auf diese Wirkstoffgruppe ansprechen, ebenfalls aktivierende Mutationen innerhalb der Tyrosin-Kinase-Domäne des EGFRs vorliegen und auch hier zu einer gesteigerten Sensitivität der Zelllinien gegenüber Inhibitoren führen. Hierfür wurden die in dieser Arbeit verwendeten HNSCC-Zelllinien auf die Existenz von aktivierenden Mutationen untersucht. Der gesamte open reading frame des EGFRs der elf Zelllinien wurde dabei auf Sequenzveränderungen im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz überprüft.

Veränderungen der kodierenden Sequenz, die nicht zu einem Aminosäure-Austausch führten und somit stille Mutationen darstellen, wurden in Kodon 134 (45%), 605 (36%), 763 (18%) und 879 (9%) beobachtet. Vier der untersuchten Zelllinien (36%) wiesen den R497K-Polymorphismus auf, der in früheren Studien bereits beschrieben wurde. Keine der Mutationen befand sich innerhalb der Tyrosin-Kinase-Domäne. Im Einklang zu früheren Studien [24, 25] scheinen Mutationen innerhalb der Kinase-Domäne des EGFRs bei HNSCC-Tumoren ein seltenes Ereignis darzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine Mutationen innerhalb der Kinase-Domäne beobachtet werden. Kürzlich wurden jedoch EGFR-Mutationen innerhalb der Kinase-Domäne in Tumoren asiatischer Patienten mit Larynx-Karzinomen mit einer Frequenz von 7,3% beschrieben [23]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass EGFR-Mutationen spezifisch bei nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen zu finden sind und ethnische Differenzen aufweisen [35]. Für die Sensitivität der HNSCC-Tumoren gegenüber Tyrosin-Kinase-

Inhibitoren scheinen Mutationen des EGFRs daher wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

5.2 Zellzyklus- und Western Blot-Untersuchung von HNSCC-Zelllinien nach EGFR-Stimulation und Inhibition

Im Rahmen einer Studie von Wang et al. wurde beim metastasierten Kolonkarzinom Hinweise darauf entdeckt, dass der Kodon 497-Polymorphismus wesentlich sensitiver gegenüber Inhibitoren ist und daher mit einer günstigen Prognose der Erkrankung korreliert [49]. Besonders Frauen, die Trägerinnen des R497K-Polymorphismus sind, scheinen eine verbesserte Prognose aufzuweisen [35]. Die K497-Variante des EGF-Rezeptors zeigte in einer weiteren Arbeit [29] *in-vitro* eine verminderte Fähigkeit zur TGF- α -Bindung und abgeschwächte intrazelluläre Signaltransduktion mit einer sich daraus ergebenden reduzierten Sensitivität gegenüber TGF- α . Dies wurde als Ursache für die deutlichen Mortalitätsunterschiede der EGFR-Varianten gedeutet. Es wurde bereits bei fortgeschrittenem Lungenkrebs beobachtet, dass der R497K-Polymorphismus mit der Chemosensitivität gegenüber Gefitinib assoziiert ist [41]. Zudem konnte in der Mehrzahl von HNSCC-Primärtumoren eine gesteigerte Expression des Rezeptors und seines Liganden TGF- α beschrieben werden [16]. Eine autokrine TGF- α -Stimulation scheint das Tumorstadium so voranzutreiben.

Um beide EGFR-Varianten auf Unterschiede im Ansprechen auf Liganden bzw. Inhibitoren zu untersuchen, wurden Zellzyklus- und Western Blot-Untersuchungen der Zelllinien beider Gruppen unter dem Einfluss des Liganden TGF- α , des Tyrosin-Kinase-Inhibitors AG1478 und des monoklonalen Antikörpers Cetuximab durchgeführt.

5.2.1 TGF- α

Im Rahmen einer Studie von Grandis et al. [16] konnte eine um bis zu fünffach erhöhte Überexpression des EGFR-Liganden TGF- α in HNSCC-Zelllinien nachgewiesen werden. Die gleichzeitige, gesteigerte Präsenz von EGFR und seinem Liganden TGF- α in HNSCCs deutet darauf hin, dass die autokrine TGF- α -Stimulation ein Tumorstadium fördert. Es konnte bereits beobachtet werden, dass der Ligand bei

HNSCC-Zelllinien zu einer Resistenzsteigerung gegenüber bestimmten Chemotherapeutika führen kann [2].

Daher wurden alle elf Zelllinien und insbesondere beide EGFR-Varianten zunächst auf Unterschiede bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber TGF- α -Stimulation untersucht. Dabei führte eine TGF- α -Stimulation bei Zelllinien der R497-Variante im Rahmen einer FACS-Analyse durchschnittlich zu einer größeren Zahl an Zellen der G0/G1-Phase und einer geringeren Anzahl an Zellen in der S-Phase, während Zelllinien der K497-Gruppe unter Liganden-Stimulation keine wesentlichen Veränderungen der Zellzyklus-Verteilung aufwiesen. Diese Ergebnisse lassen sich möglicherweise durch die Beobachtung einer Studie von Moriai et al. [29] erklären, in der bei Zelllinien der K497-Variante *in-vitro* eine verminderte Fähigkeit zur TGF- α -Bindung beschrieben wurde.

Bei der Western Blot-Untersuchung konnte bei einem Großteil der Zelllinien (sieben der elf Zelllinien) kein eindeutiger Anstieg der EGFR- und Erk-Phosphorylierung unter steigenden TGF- α -Konzentrationen beobachtet werden, während die Zelllinien bereits in unbehandeltem Zustand eine starke Phosphorylierung zeigten. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass diese Zelllinien bereits durch autokrine Liganden maximal stimuliert wurden und daher eine konstitutive Aktivierung aufwiesen. Ein geringer Anstieg der EGFR- und Erk-Phosphorylierung unter TGF- α -Stimulation (bis zu 1 ng/ml) konnte lediglich in den Zelllinien UM-SCC-1, -27, UMB-SCC-969 und UT-SCC-24A demonstriert werden. Eine Ursache für diese Feststellung sind möglicherweise Quantitätsunterschiede in der autokrinen TGF- α -Expression. Zelllinien mit einem hohen Maß an TGF- α -Expression könnten bereits ohne exogene TGF- α -Zugabe einer maximalen Aktivierung unterliegen. Zelllinien, die eine geringere Liganden-Expression aufweisen, reagieren scheinbar noch mit einer geringen Aktivitätssteigerung, da sich der Rezeptor noch nicht in maximal aktiviertem Zustand befindet und noch Bindungskapazität bis zu einer vollständigen Besetzung aller Rezeptoren besitzt. Eine konstitutive Aktivierung konnte bereits in früheren Studien innerhalb von Tumorzellen aus Pankreaskarzinomen beobachtet werden [37]. Die konstitutive Aktivierung wurde dort als Ursache einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor Gefitinib beschrieben.

Eine Überstimulation des Rezeptors mit hohen TGF- α -Konzentrationen führte in acht der elf Zelllinien (UM-SCC-1, -3, -14A, -22B, -27, UMB-SCC-745, -969, UT-SCC-24A) zu einer Reduktion der EGFR- und Erk-Phosphorylierung. Dies ist auf eine Internalisierungs-abhängigen Degradation des Rezeptors zurückzuführen und konnte bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden [9, 40]. Die Zelllinien UM-SCC-14A, -22B und -27 wiesen dabei bereits bei geringerer Ligandenkonzentration (10 ng/ml) eine Phosphorylierungsreduktion auf als die Zelllinien UM-SCC-1,-3, UMB-SCC-745, -969 und UT-SCC-24A, welche diesen Effekt erst bei einer TGF- α -Konzentration von 100 ng/ml zeigten. Eine hohe TGF- α -Konzentration (100ng/ml) führte in den Zelllinien UM-SCC-3, -14A, -22B, -27, UMB-SCC-745 und -969 zu einer kompletten Inhibition der Erk-Phosphorylierung. Die Beobachtung eines Abfalles der Erk-Phosphorylierung vor der EGFR-Phosphorylierung, der in einigen Zelllinien erkennbar war, lässt sich möglicher Weise dadurch begründen, dass die maximal phosphorylierten Rezeptoren zwar noch mittels Western Blot dargestellt werden konnten, diese jedoch nicht mehr in der Lage waren, Wachstumssignale zu vermitteln.

5.2.2 AG1478

Die Ko-Expression von EGFR und seinem Liganden TGF- α in HNSCCs deutet darauf hin, dass die autokrine TGF- α -Stimulation das Tumorwachstum fördert. Diese Wachstumsstimulation wird über die Aktivierung des EGFRs vermittelt und bietet einen Angriffspunkt für eine EGFR-spezifische Therapie mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren und Antikörpern. Bei Patienten mit nichtkleinzelligen Bronchial-Karzinomen konnten sensitivitätssteigernde Mutationen innerhalb der Tyrosin-Kinase-Domäne beobachtet werden, welche ein drastisches Ansprechen der Tumorzellen auf EGFR-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren zur Folge hatten [26, 34]. Tumorzelllinien aus kolorektalen Tumoren, welche der K497-Gruppe angehörten wurden dabei als wesentlich sensibler gegenüber Inhibitoren und prognostisch günstig beschrieben [46].

Daher wurden die in dieser Arbeit verwendeten HNSCC-Zelllinien auf Auswirkungen des R497K-Polymorphismus bezüglich Sensitivitätsveränderungen gegenüber Tyrosin-Kinase-Inhibitoren untersucht. Zusätzlich konnte in einer früheren Studie von Pino et al. [37] eine direkt lineare Korrelation zwischen Gefitinib-Sensitivität und der autokrinen

TGF- α -Expression beschrieben werden. Dabei wiesen Gefitinib-sensitive, unbehandelte Zelllinien bereits eine konstitutive EGFR-Aktivierung mit einer hohen EGFR-Grundphosphorylierung auf. Eine Gefitinib-Zugabe führte zur Aufhebung der EGFR- und Erk-Phosphorylierung in Gefitinib-sensitiven Zelllinien, während resistente Zelllinien unbeeinflusst schienen. Um die Existenz dieses Phänomens in den verwendeten, scheinbar konstitutiv aktivierten HNSCC-Zelllinien zu untersuchen, wurden die elf Zelllinien mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor AG1478 behandelt.

Der Kinaseinhibitor AG1478 führte im Rahmen der FACS-Analyse zu einem dramatischen Anstieg von Zellen in der subG1-Phase (tote Zellen) bei gleichzeitigem Abfall der S-Phasen-Population beider EGFR-Varianten. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu Ergebnissen einer Studie an Tumorzellen aus nasopharyngealen Karzinomen, welche nach einer Behandlung mit dem Tyrosin-Kinase-Inhibitor AG1478 ausschließlich ein Zellzyklus-Arrest innerhalb der G1-Phase zeigten [51]. Zelllinien der K497-Variante wiesen im Vergleich zur R497-Variante durchschnittlich einen höheren Anteil an Zellen in der subG1-Phase auf, was ein bereits beschriebenes, besseres Ansprechen der K497-Gruppe auf Inhibitoren bestätigt [46].

Die Western Blot-Untersuchungen zeigten bei allen elf Zelllinien unter AG1478 eine Reduktion der Rezeptor-Phosphorylierung. Ein besonders ausgeprägter Effekt des Tyrosin-Kinase-Inhibitors konnte sowohl in den Zelllinien mit K497-Polymorphismus UM-SCC-14A, -27, -969 und UT-SCC-24A als auch den R497-Zelllinien UM-SCC-1 und UT-SCC-26A dargestellt werden. Sieben der elf Zelllinien (UM-SCC-3, -4, -14A, -22B, -27, UMB-SCC-745, -969) zeigten eine gleichzeitige Reduktion der Erk-Phosphorylierung. UM-SCC-22B, -27, UMB-SCC-745 und -969 sprachen besonders deutlich auf eine Hemmung mit AG1478 an. Zelllinien der K497-Variante schienen keine signifikanten Unterschiede im Ansprechen auf den EGFR-spezifischen Inhibitor im Vergleich zur R497-Variante aufzuweisen.

In den in dieser Arbeit verwendeten elf Zelllinien konnte kein Zusammenhang zwischen einer konstitutiven Aktivierung und einer Sensitivität gegenüber AG1478 festgestellt werden. Zelllinien ohne konstitutive Aktivierung wiesen keine Resistenz gegenüber AG1478 auf. Diese Beobachtung steht in Widerspruch zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Pino et al. [37], die eine gesteigerte Sensitivität bei Zelllinien

beobachten ließen, welche eine konstitutive Aktivierung in unbehandeltem Zustand zeigten. Einen möglichen Grund für die Divergenz der Ergebnisse mag dabei die Verwendung zweier unterschiedlicher Vertreter der Tyrosin-Kinase-Inhibitoren sein.

5.2.3 Cetuximab

Die Inkubation mit dem monoklonalen anti-EGFR-Antikörper Cetuximab führte ebenfalls zu einem Anstieg der Zellen in der subG1-Phase (tote Zellen) mit einem Abfall der Zellzahl innerhalb der S-Phase. Die Zelllinien der K497-Variante wiesen dabei im Vergleich zur R497-Variante bei beiden Inhibitoren ein wesentlich sensitiveres Ansprechen auf. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen einer anderen Gruppe [46] und weist darauf hin, dass Patienten mit einem K497-Polymorphismus deutlich sensibler auf eine Therapie ansprechen können, als solche mit einer R497-Variante. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass der Polymorphismus im Bereich des Kodon 497 in der Tat eine mögliche Ursache für die bereits beschriebenen Unterschiede im Ansprechen auf Inhibitoren und damit ein möglicherweise entscheidender Faktor für die Prognose der Therapie sein könnte. In einer weiteren Studie [50] wurde gezeigt, dass der Einfluss, den Cetuximab auf die Zellzyklus-Verteilung von Tumorzellen der oberen Luft- und Speisewege ausübt, nur gering ist. Diese Beobachtung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gemacht werden. Hier ließ sich ein deutlicher Einfluss des monoklonalen Antikörpers auf die Zellzyklus-Verteilung der elf Zelllinien nachweisen.

Im Rahmen der Western Blot-Analyse zeigte sich unter dem Einfluss von Cetuximab überraschender Weise in sechs der elf untersuchten Zelllinien (UM-SCC-1, -3, -27, UMB-SCC-745, -864, UT-SCC-24A) eine Hyperphosphorylierung des EGF-Rezeptors (siehe Abbildung 4.6). Diese Beobachtung könnte möglicherweise auf eine Aktivierung des EGFRs über einen Mimikry-Effekt des monoklonalen Antikörpers hindeuten, der an der gleichen Bindungsstelle des EGFRs bindet wie seine Liganden. In einer früheren Studie [28] wurde das Phänomen der paradoxen Hyperphosphorylierung in HNSCC-Zelllinien bereits beobachtet. Hier konnte nachgewiesen werden, dass der Antikörper Cetuximab in hoher Konzentration ebenfalls zu einer Aktivierung des EGFRs führt. Diese Beobachtungen konnten auch in nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen gemacht

werden [31]. Im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit resultierte eine Cetuximab-Zugabe dort jedoch mit einer verminderten Erk-Phosphorylierung der Tumorzelllinien. Eine weitere Studie zeigte sogar einen agonistischen Effekt von Cetuximab auf das Wachstum von HNSCC-Zelllinien [32], was möglicherweise auf eine Hyperphosphorylierung unter dem Inhibitor zurückzuführen sein mag.

In nur drei der elf Zelllinien, UM-SCC-14A, UMB-SCC-969 und UT-SCC-26A, führte Cetuximab zu einer verminderten Phosphorylierung des Rezeptors. In nur fünf von elf Zelllinien konnte unter Cetuximab eine Verringerung der Erk-Phosphorylierung beobachtet werden. Zelllinien der K497-Variante wiesen im Vergleich zur R497-Variante keine wesentlichen Unterschiede im Ansprechen auf den monoklonalen Antikörper auf.

5.2.4 Inkubation der Zelllinien mit Inhibitoren bei Liganden-Stimulation

TGF- α wird, wie bereits beschreiben, in Zelllinien aus HNSCC-Tumoren in starkem Maß autokrin exprimiert [13]. Um zu überprüfen, ob eine Inhibition unter gleichzeitiger Zugabe des Liganden zu einer veränderten Wirkung der Inhibitoren führt, wurden die elf Zelllinien sowohl mit TGF- α , als auch mit jeweils einem Inhibitor inkubiert. Im Anschluss wurden die elf Zelllinien mittels FACS- und Western Blot-Analyse auf Veränderungen des inhibitorischen Effektes untersucht.

Eine Inkubation der Zelllinien mit den Inhibitoren AG1478 unter Liganden-Stimulation zeigte keinen Effekt auf die Wirkung des Tyrosin-Kinase-Inhibitors.

Cetuximab führte bei Stimulation der Zelllinien mit TGF- α bei Zelllinien der K497-Variante zu einem verminderten Effekt der Inhibitoren mit einer verminderten Anzahl der subG1-Zellen. Zelllinien der R497-Variante blieben bei einer Inkubation mit dem Inhibitor und TGF- α bezüglich der Zellzahl in der subG1-Phase unbeeinflusst. Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen vermuten, dass eine autokrine Expression des EGFR-Liganden TGF- α , wie sie bereits oft bei HNSCC-Tumoren nachgewiesen werden konnte, den Effekt eines Inhibitors Cetuximab in negativer Weise beeinflussen kann, während der Effekt von AG1478 unbeeinflusst scheint.

Insgesamt bewirkte AG1478 unter Stimulation mit TGF- α im Rahmen der Western Blot-Analyse im Großteil der Zelllinien einen unveränderten Effekt des Inhibitors bezüglich der EGFR- oder der Erk-Phosphorylierung. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass eine Inhibition unter TGF- α -Stimulation, wie sie bei einer autokrinen TGF- α -Expression in HNSCC bereits häufig beobachtet werden konnte [12], bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien scheinbar keinen Einfluss auf den inhibitorischen Effekt von AG1478 hat. Der Vergleich der beiden EGFR-Varianten konnten keine Unterschiede im Ansprechen auf die Behandlung nachweisen.

Die zeitgleiche Behandlung der Zelllinien mit Cetuximab und TGF- α bewirkte bei vier der elf Zelllinien eine Verstärkung des inhibitorischen Effektes auf die EGFR-Phosphorylierung, darunter drei der sechs unter alleiniger Cetuximab-Inkubation hyperphosphorylierten Zelllinien. UMB-SCC-864 wies nur eine verminderte Erk-Phosphorylierung auf. Bei den Zelllinien UM-SCC-4 und UMB-SC-969 konnte eine Verminderung des hemmenden Cetuximab-Effekts auf die EGFR-Phosphorylierung beobachtet werden. Es wurden keine Unterschiede der beiden EGFR-Varianten bezüglich ihrer Sensitivität festgestellt.

5.3 Immunzytochemische Darstellung von EGFR in den untersuchten HNSCC-Zelllinien

In einigen früheren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einer EGFR-Überexpression mit dem klinischen Ansprechen auf Gefitinib in *non-small cell lung cancer* (NSCLC) und HNSCC beobachtet [4, 11, 45]. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob dieses Phänomen auch auf die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien zutrifft, wurden sie auf Unterschiede in der Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche, das zelluläre Verteilungsmuster des Rezeptors nach Liganden-Stimulation und die Internalisierungs-abhängige Degradation untersucht. Insbesondere sollte analysiert werden, ob bei Zelllinien der beiden EGFR-Varianten Unterschiede der Expression des Rezeptors zu beobachten sind.

In Abwesenheit von exogen zugefügten Liganden (TGF- α) zeigte die immunzytochemische Untersuchung, dass EGFR beim Großteil der Zelllinien streng membranständig lokalisiert ist. Die Zelllinie UM-SCC-4 besaß eine schwache membranäre, dafür

hauptsächlich zytoplasmatische Färbung. Zwei Zelllinien (UM-SCC-27, UMB-SCC-745) zeigten eine ausschließlich intrazelluläre Lokalisation des EGFRs. Diese Beobachtungen könnten besonders bei Zellen mit deutlich intrazellulärem EGFR-Anteil auf eine autokrine Sekretion von TGF- α hinweisen, die bereits über eine Autostimulation von EGFR zur Aktivierung und Internalisierung des Rezeptors geführt haben könnte. Ein Unterschied zwischen den beiden EGFR-Varianten ließ sich hierbei nicht nachweisen.

Eine TGF- α -Stimulation bewirkte in allen Zelllinien eine Reduktion der Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Gleichzeitig führte es zu einer zunehmenden Internalisierung der Rezeptoren und einer verstärkt zytoplasmatischen Färbung. Diese Beobachtungen lassen sich mit einer Internalisierung des Liganden-stimulierten Rezeptors via Clathrin-coated Pits und einem Transport in den Endosomen ins Innere der Zelle erklären, was bereits in früheren Arbeiten [47] beschrieben wurde. Innerhalb der Endosomen findet eine Sortierung der Rezeptoren statt, nach der ein Teil der Rezeptoren an die Oberfläche der Zelle zurück transportiert wird. Die übrigen Rezeptoren werden in den Lysosomen abgebaut. Eine Überstimulation der Zelllinien mit TGF- α führte in neun der elf Zelllinien zu einer vollständigen Internalisierung der Rezeptoren. UM-SCC-14A und UM-SCC-22B wiesen hingegen noch Rest-Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche auf, was auf eine unvollständige Internalisierung und möglicherweise verbliebene Stimulationsfähigkeit dieser Zelllinien schließen lässt.

5.4 Immunzytochemische Untersuchung beider EGFR-Varianten auf Unterschiede in der TGF- α -Expression

In einigen Publikationen wurde bereits bei einer Vielzahl von Tumoren eine gleichzeitige Überexpression des EGF-Rezeptors und seines Liganden TGF- α belegt [18, 27, 48]. Auch in der Mehrzahl der Primärtumoren der HNSCCs wurde eine verstärkte Expression des Rezeptors und des Liganden beschrieben [15]. Diese Beobachtungen lassen eine autokrine, konstitutive Aktivierung des EGFRs vermuten. Der wichtigste autokrine Ligand des EGF-Rezeptors, der von epithelialen Tumoren exprimiert wird, ist dabei TGF- α . Es wird aus einem in die Zellmembran integrierten Vorläufer-Protein, pro-TGF- α genannt, freigesetzt. Dieser Vorgang beruht auf

Proteasen, die das reife TGF- α vom Vorläufer-Protein abspalten. In vielen neoplastischen Zellen läuft die proteolytische Prozessierung unvollständig oder verlangsamt ab, was ein Überwiegen der membrangebundenen Form zur Folge hat. Durch die Expression des Liganden auf der Zelloberfläche sind die betroffenen Zellen in der Lage, die EGF-Rezeptoren auf benachbarten Zellen zu aktivieren und massiv zu stimulieren [46]. Es wurde bereits eine direkte, lineare Korrelation zwischen einer verstärkten TGF- α -Expression und einer erhöhten Sensitivität gegenüber Gefitinib in Pankreas-Tumoren beobachtet [37]. Anhand einer immunzytochemischen Untersuchung sollten die elf, in dieser Arbeit verwendeten HNSCC-Zelllinien auf eine solche autokrine TGF- α -Expression hin untersucht werden. Mittels dieser Untersuchung konnte kein Signal im Bereich der Plasmamembran nachgewiesen werden, was auf das Vorhandensein eines Vorläufer-Proteins schließen lassen würde. Die Zelllinien wiesen lediglich eine zytoplasmatische Färbung auf. Es konnten keine wesentlichen Unterschiede bei beiden EGFR-Gruppen bezüglich der Expression des autokrinen Liganden nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die Zelllinien Unterschiede im zytoplasmatischen Verteilungsmuster. In zwei Zelllinien (UM-SCC-1, UT-SCC-26A) wurde ein homogenes, in den übrigen Zelllinien ein granuläres Verteilungsmuster beobachtet. Eine mögliche Erklärung für das granuläre Verteilungsmuster des Liganden innerhalb des Großteils der Zelllinien könnte dabei zum Beispiel die Darstellung des Liganden-Rezeptor-Komplexes im Rahmen der Liganden-abhängigen Internalisierung in Endosomen sein. In diesem Komplex befindet sich reifes TGF- α , das mittels des verwendeten Antikörpers detektiert werden kann. Pro-TGF- α , das sich auf der Oberfläche der Zellen befindet, kann dabei durch den verwendeten Antikörper möglicher Weise nicht dargestellt werden.

5.5 Induktion der Aktin-Expression nach TGF- α -Stimulation

Zur Ladungskontrolle wurde im Rahmen der Western Blot-Untersuchung ein anti-Aktin-Antikörper verwendet, der zur internen Kontrolle der Proteinkonzentrationen in den Geltaschen dient. Als Ladungskontrolle werden zu diesem Zweck spezielle, ubiquitär und konstitutiv exprimierte „housekeeping“-Gene eingesetzt. Aktin, ein Hauptbestandteil zytoplasmatischer Mikrofilamente eukaryoter Zellen, ist eine der meist

genutzten Ladungskontrollen. Es spielt eine wichtige Rolle für diverse zelluläre Funktionen, wie Strömungen des Zytoplasmas, Veränderungen der Zellmorphologie, Zellteilung, Zellmotilität und -invasivität. Im Rahmen der Western Blot-Untersuchungen wurde Aktin hier ebenfalls als Ladungskontrolle verwendet. Interessanter Weise konnte unter TGF- α -Stimulation ein Anstieg der Aktin-Expression in vier der elf Zelllinien (UM-SCC-1, -4, UMB-SCC-745, -864) beobachtet werden. Diese Beobachtung ließ vermuten, dass eine TGF- α -Stimulation möglicherweise mit einer Zunahme des invasiven Verhaltens der betroffenen Zellen assoziiert sein könnte. Da eine gesteigerte Expression von Aktin durch eine TGF- α -Behandlung hervorgerufen werden kann und damit Ungenauigkeiten im Rahmen einer Ergebnisinterpretation entstehen, sollte bei Western Blot-Analysen TGF- α -stimulierter Zellen Aktin daher zukünftig nicht als Ladungskontrolle verwendet werden.

5.6 Invasions-Assay

HNSCCs sind bekannt für ihre frühe, lymphatische Metastasierung. Mit einem Invasions-Assay ist es möglich das Invasionsverhalten von HNSCC-Zelllinien zu untersuchen. Da Aktin innerhalb einer Zelle der Motilität und Invasionsfähigkeit dient, wurde mittels des Invasions-Assays geprüft, ob Zelllinien, die eine gesteigerte Aktin-Expression unter TGF- α zeigten, ein invasiveres Wachstumsverhalten aufweisen als die Zelllinien, welche dieses Phänomen nicht beobachten ließen. Untersucht wurden die Zelllinien UM-SCC-1, -4, UMB-SCC-745 und -864. Das invasive Verhalten dieser Zelllinien wurde verglichen mit dem von Kontrollzellen (MDCK-C/-Zellen, UM-SCC-3 und UMB-SCC-969), welche unter Stimulation keinen Anstieg der Aktin-Expression zeigten. Eine TGF- α -Stimulation wies dabei einen invasivitätssteigernden Effekt auf die Zelllinie UMB-745 und UMB-SCC-864 auf. Die Zelllinie UM-SCC-4 schien insgesamt deutlich invasiver, da sowohl in unbehandeltem als auch in stimuliertem Zustand ein rascher Abfall des transepithelialen, elektrischen Widerstandes zu beobachten war. Die Zelllinie UM-SCC-1 wies keinen Effekt des Liganden auf die Invasivität der Zelllinie auf. Zusammenfassend konnte kein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Aktin-Expression unter TGF- α -Stimulation und einer gesteigerten Invasivität der betroffenen Zelllinien beobachtet werden.

6 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome stellen mehr als 90% aller Malignome des oberen Aerodigestivtraktes dar. Diese auch als HNSCC (Head and Neck Squamous Cell Carcinomas) bezeichneten Tumoren überexprimieren in bis zu 100% den Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR; Epidermal Growth Factor Receptor), wobei die Prognose der Patienten eng mit dem Grad der EGFR Überexpression korreliert. Aus diesem Grunde stellt der EGF-Rezeptor ein zentrales therapeutisches Ziel bei der Behandlung von HNSCC-Tumoren dar. Hierbei haben sich in den vergangenen Jahren verschiedene EGFR-Inhibitoren etabliert, wobei einerseits monoklonale Antikörper, welche darauf abzielen die extrazelluläre Bindungsstelle der natürlichen EGFR-Liganden (EGF, TGF- α) zu blockieren (Bsp. Cetuximab) als auch kleinmolekulige Inhibitoren, welche intrazellulär durch kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle, die Kinasedomäne des Rezeptors hemmen (Bsp. Gefitinib), zu nennen sind. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass Lungenkarzinome, welche Mutationen im Bereich der EGFR-Kinasedomäne aufweisen, außerordentlich gut auf eine Therapie mit Kinase-Inhibitoren ansprechen, ist eine Kenntnis des Mutationsstatus bei EGFR überexprimierenden Tumoren von klinisch-therapeutischer Bedeutung. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher anhand von etablierten HNSCC-Zelllinien einen möglichen Zusammenhang zwischen EGFR-Sequenzvariationen und EGFR-Aktivierungsstatus aufzudecken. Aus diesem Grunde wurde zunächst der EGFR-Mutationsstatus in den zu untersuchenden HNSCC-Zelllinien bestimmt. Nach Durchführung einer RT-PCR Sequenzierung der gesamten „*Open Reading Frame*“ des EGF-Rezeptors ergaben sich bei keiner der getesteten Zelllinien Hinweise auf das Vorliegen von Mutationen. In vier von elf Zelllinien (36%) zeigte sich jedoch das Vorliegen eines Kodon-497-Polymorphismus, welcher die Aminosäure Lysin (K) anstelle der häufiger auftretenden Aminosäure Arginin (R) kodiert. Da andere Gruppen beim metastasierten Kolonkarzinom Hinweise darauf fanden, dass der Kodon 497 Polymorphismus mit der Prognose der Erkrankung korreliert, wurden in den folgenden Untersuchungen Zelllinien der einen EGFR-Variante mit denen der anderen Variante verglichen.

Bei der Zellzyklusanalyse zeigte sich nach TGF- α -Stimulation für die K497-Gruppe eine durchschnittlich höhere Anzahl von Zellen in der S-Phase und eine niedrigere Anzahl in der G0/G1-Phase im Vergleich zur R497-Variante. Nach Inkubation der Zellen mit dem EGFR-spezifischen Kinase-Inhibitor AG1478 oder dem monoklonalen anti-EGFR-Antikörper Cetuximab kam es bei den meisten Zelllinien zu einem dramatischen Anstieg von Zellen in der subG1-Phase des Zellzyklus (tote Zellen). Ein Vergleich beider Gruppen zeigte für die K497-Zellen nach Inkubation mit beiden Inhibitoren einen im Durchschnitt höheren Anteil an Zellen in der subG1-Phase.

Eine Western Blot-Untersuchung erbrachte im Vergleich keinen Hinweis auf Unterschiede in der Sensitivität der beiden EGFR-Varianten gegenüber den Inhibitoren.

Eine immunzytochemische Untersuchung der HNSCC Zelllinien unter Standard-Kulturbedingungen zeigte, dass der EGF-Rezeptor, in Abwesenheit von exogen zugeführten Liganden, bei einigen Zelllinien streng membranständig lokalisiert ist, wohingegen andere Zelllinien auch einen deutlichen Anteil an intrazellulär lokalisiertem Rezeptor aufweisen. Diese Beobachtung weist, insbesondere bei Zellen mit deutlich intrazellulärem EGFR, auf eine autokrine Sekretion von TGF- α hin, die über eine Autostimulation von EGFR zur Aktivierung und Internalisierung des Rezeptors führt. Ein Unterschied zwischen den zwei Gruppen K497 und R497 war hierbei nicht auffällig.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass EGFR-Mutationen in HNSCC-Tumorzellen ein seltenes Ereignis darstellen, was mit vereinzelten Berichten anderer Gruppen in Übereinstimmung steht. Die EGFR-Sequenzanalyse ergab jedoch bei vier von elf Zelllinien einen K497-Polymorphismus. Beim Vergleich der Zelllinien, die entweder den K497- oder R497-Polymorphismus aufwiesen, fanden sich Hinweise auf unterschiedliche Empfindlichkeiten auf TGF- α und die EGFR-Inhibitoren Cetuximab und AG1478. Diese erreichten jedoch keine Signifikanz, was mit der begrenzten Zahl an Zelllinien in Verbindung gebracht werden kann. Weiterführende Untersuchungen sollten darauf abzielen, die potentielle pathogenetische und klinisch-therapeutische Bedeutung des Kodon-497-Polymorphismus im EGFR näher aufzuschlüsseln und zu verifizieren.

7 Literaturverzeichnis

1. Bandres E, Barricarte R, Cantero C et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) polymorphisms and survival in head and neck cancer patients. *Oral Oncology* 2007; 43: 713–71
2. Baumeister P, Reiter M et al. Transforming growth factor alpha stimulation of mucosal tissue cultures from HNSCC patients increases chemoresistance to Cisplatin. *Chemotherapy* 2010 Aug;9;56(4):268-274
3. Brunner K, Fischer CA et al. EGFR (HER) family protein expression and cytogenetics in 219 SCC of the upper respiratory tract: ERBB2 overexpression independent prediction of poor prognosis. *Analytical and quantitative cytology and histology* 2010 Apr;32(2):78-89
4. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:643–655
5. Chung CH, Elv K, McGavran L, Varella-García M, Parker J et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4170–4176
6. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* 2004; 5: 489-500

7. Ciardiello F, Tortora G et al. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970
8. Davis NL, Kluftinger A et al. Prognostic markers of colorectal cancer: an evaluation of DNA content, epidermal growth factor receptor, and Ki-67. *J Surg Oncol* 1992; 51: 147-152
9. Dikic I et al. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochem. Soc. Trans* 2003; 31: 1178-1181
10. Döbrossy L et al. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 9-17
11. Frederick BA, Helfrich BA, Coldren CD et al. Epithelial to mesenchymal transition predicts gefitinib resistance in cell lines of head and neck squamous cell carcinoma and non-small cell lung carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1683–1691
12. Fry DW et al. Inhibition of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases as an approach to cancer chemotherapy: progression from reversible to irreversible inhibitors. *Pharmacol. Ther.* 1999; 82, 207–218
13. Gekle M, Wunsch S, Oberleithner H, Silbernagl S et al. Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch* 1994; 428 (2): 157–162
14. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 1311–1318

15. Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE et al. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 824–32
16. Grandis JR, Tweardy DJ et al. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 3579–3584
17. Hama T, Yuza Y et al. Prognostic significance of epidermal growth factor phosphorylation and mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncologist* 2009 Sep;14(9): 900-8
18. Jares P, Fernandez PL, Campo E, Nadal A, Bosch F, Aiza G, Nayach I, Traserra J: PRAD-1/cyclin D1 gene amplification correlates with messenger RNA overexpression and tumor progression in human laryngeal carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 4813-4817
19. Johnson DG and Walker CL: Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39: 295-312
20. Kalish LH, Kwong RA, Cole IE et al. Deregulated cyclin D1 expression is associated with decreased efficacy of the selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7764–7774
21. Kang X, Patel D, Ng S et al. High affinity Fc receptor binding and potent induction of antibodydependent cellular cytotoxicity (ADCC) in vitro by anti-epidermal growth factor receptor antibody cetuximab. *J.Clin. Oncol. (Meeting Abstracts)* 2007; 25: 3041

22. Kim S, Grandis JR, Rinaldo A, Takes RP and Ferlito A: Emerging perspectives in epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer. *Head Neck* 2008; 30: 667-674

23. Lee JW, Soung YH, Kim SY et al.: Somatic mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2879-2882

24. Lemos-González Y, Páez de la Cadena M, Rodríguez-Berrocal F.J. Absence of Activating Mutations in the EGFR Kinase Domain in Spanish Head and Neck Cancer Patients *Tumor Biol* 2007; 28: 273–279

25. Loeffler-Ragg J, Witsch-Baumgartner M, Tzankov A et al. Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma *European Journal of Cancer* 2006; 42: 109 –111

26. Lynch TJ, Bogart JA, Curran WJ, Jr. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129–39

27. Mandic R, Eikelkamp N, Peldszus R, Sadowski M, Sesterhenn AM, Dunne AA and Werner JA: Variations of EGF-R surface expression in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Anticancer Res* 2001; 21: 3413-3418

28. Mandic R, Rodgarkia-Dara CJ, Zhu L, Folz BJ, Bette M, Weihe E, Neubauer A and Werner JA: Treatment of HNSCC cell lines with the EGFR-specific inhibitor cetuximab (Erbix) results in paradox phosphorylation of tyrosine 1173 in the receptor. *FEBS Lett* 2006; 580: 4793-4800

29. Moriai T, Kobrin MS, Hope C, Speck L et al. A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994; 91: 10217–10221
30. Moriai T, Kobrin MS, Korc M. Cloning of a variant epidermal growth factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 191: 1034–1039
31. Mukohara T, Engelman JA et al. Differential effects of gefitinib and cetuximab on NSCLC bearing epidermal growth factor mutations, *J. Natl. Cancer Inst.* 2005; 97: 1185-1194
32. Niu G, Sun X et al. Cetuximab-based immunotherapy and radioimmunotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer Research* 2010 Apr. 1; 16(7);2095-105
33. Normanno N, De Luca A, Bianco C et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 2006; 366: 2–16
34. Paez JG, Janne PA, Lee JC et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497–500
35. Pao W, Miller VA et al. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2556–68
36. Partik G, Hochegger K, Schorkhuber M et al. Inhibition of epidermal-growth-factor-receptor-dependent signalling by tyrphostins A25 and AG1478 blocks growth and induces apoptosis in colorectal tumor cells in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 379–388

37. Pino MS, Shrader M, Baker CH et al. Transforming Growth Factor A Expression Drives Constitutive Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Activation and Sensitivity to Gefitinib(Iressa) in Human Pancreatic Cancer Cell Lines. *Cancer Res* 2006; 66, 3802-3813

38. Press A, Zhang W et al. Gender-related survival differences associated with EGFR polymorphism in metastatic colon cancer. *Cancer Res.*, 2008 Apr. 15; 68 (8):3037-42

39. Raben D et al. The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 795-805

40. Rowinsky EK et al. The erbB family: targets for therapeutic development against cancer and therapeutic strategies using monoclonal antibodies and tyrosin kinase inhibitors. *Annu. Rev. Med.* 2004; 55: 433-457

41. Sasaki H, Okuda K et al. EGFR polymorphism is a favorable prognostic factor for advanced lung cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2009 Feb;135(2):313-318

42. Sartor CI et al. Biological modifiers as potential radiosensitizers: targeting the epidermal growth factor receptor family. *Semin Oncol* 2000; 27: 15-20

43. Sewell JM et al. Role of TGF α stimulation of the ERK, PI3 kinase and PLC γ pathways in ovarian cancer growth and migration *Experimental Cell Research* 2005; 304: 305– 316

44. Silva, N, Shedd DP et al. Pattern of lymphatic spread in pharyngeal cancer. *J. Surg. Oncol.*1971; 3: 415-419

45. Taguchi T, Tsukuda M, Imagawa-Ishiguro Y, Kato Y, Sano D. Involvement of EGFR in the response of squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines to gefitinib. *Oncol Rep* 2008; 19: 65–71

46. Wang ST et al. The TGF- α Precursor Expressed on the Cell Surface Binds to the EGF Receptor on Adjacent Cells, Leading to Signal Transduction. *Cell* 1989; 56: 495-506

47. Waterman H, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases. *FEBS Letters* 2001; 490: 142–152

48. Weichselbaum RR, Dunphy EJ, Beckett MA, Tybor AG et al. Epidermal growth factor receptor gene amplification and expression in head and neck cancer cell lines. *Head Neck* 1989; 11: 437-442

49. Wang WS, Chen PM, Chiou TJ et al. Epidermal growth factor receptor R497K polymorphism is a favorable prognostic factor with colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007 Jun 15;13(12):3597-604.

50. Yamatodani T et al. Epidermal growth factor receptor status and persistent activation of Akt and p44/42 MAPK pathways correlate with the effect of cetuximab in head and neck and colon cancer cell lines *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135:395–402

51. Zhu XF, Liu ZC, Xie BF et al. EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* 2001; 169: 27–32

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

a.d.	Aqua Destillata
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
evtl.	eventuell
FCS	Fetal calf Serum (fötales Kälberserum)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals Bereichs)
HRP	Horseradish-Peroxidase
kDa	Kilodalton
m	milli
M	molar
MAP	Mitogen-Activated Protein
min	Minute
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
μ	mikro
n	nano
NSCLC	Non-small Cell Lung Cancer
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
RNA	Ribonucleic Acid
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung

TEER	Transepithelial electrical resistance, transepithelialer elektrischer Widerstand
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- α	Transforming Growth Factor α
TNM	Tumor-Node-Metastasis (Primärtumor- Lymphknoten-Fernmetastase)
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
WB	Western Blot
z.B.	Zum Beispiel

8.2 Histogramme der FACS-Analyse

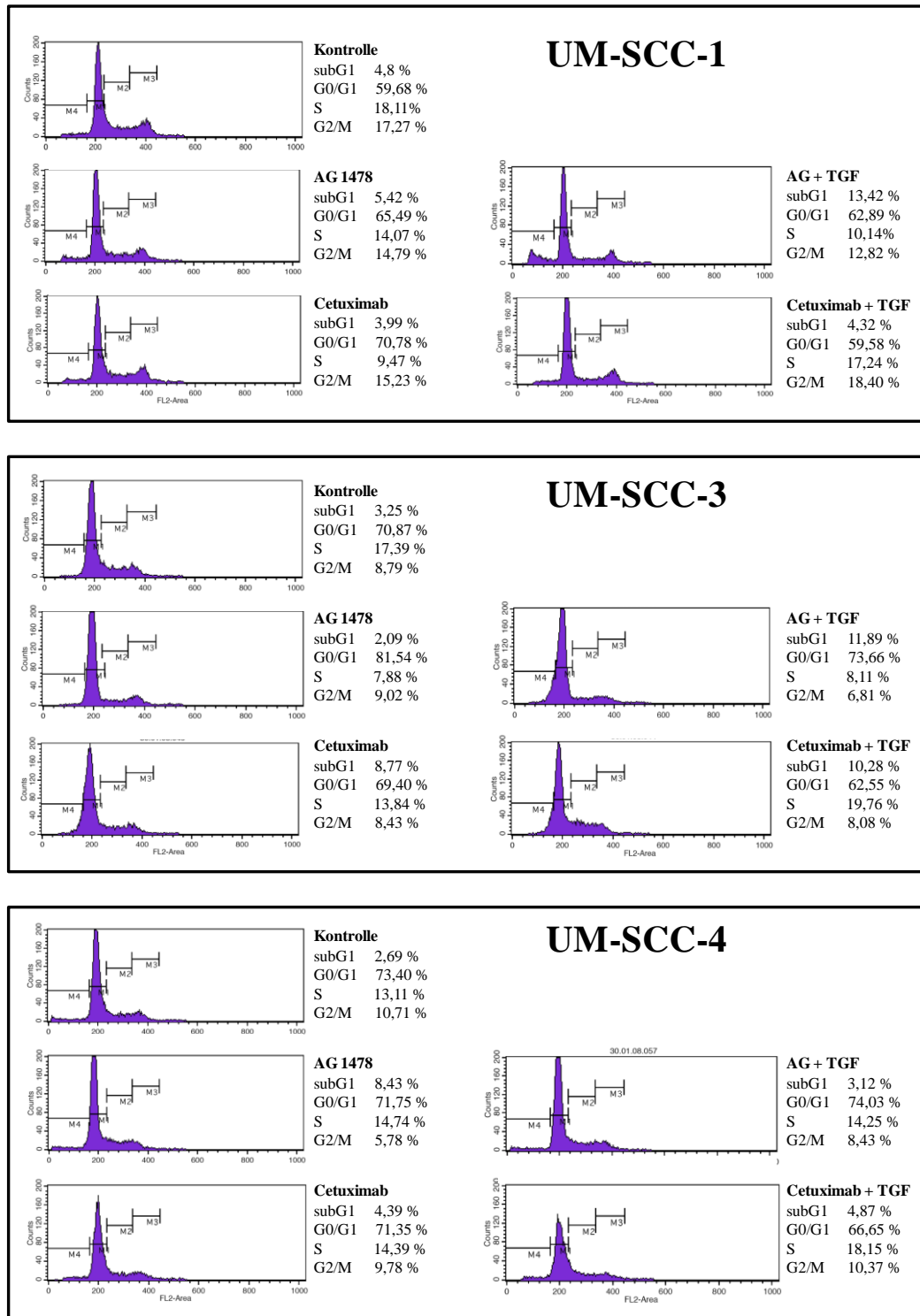


Abbildung 8.1 Histogramme der FACS-Analyse der elf Zelllinien in unbehandeltem Zustand, unter TGF- α , AG1478, Cetuximab und unter Inhibition bei Liganden-Stimulation.

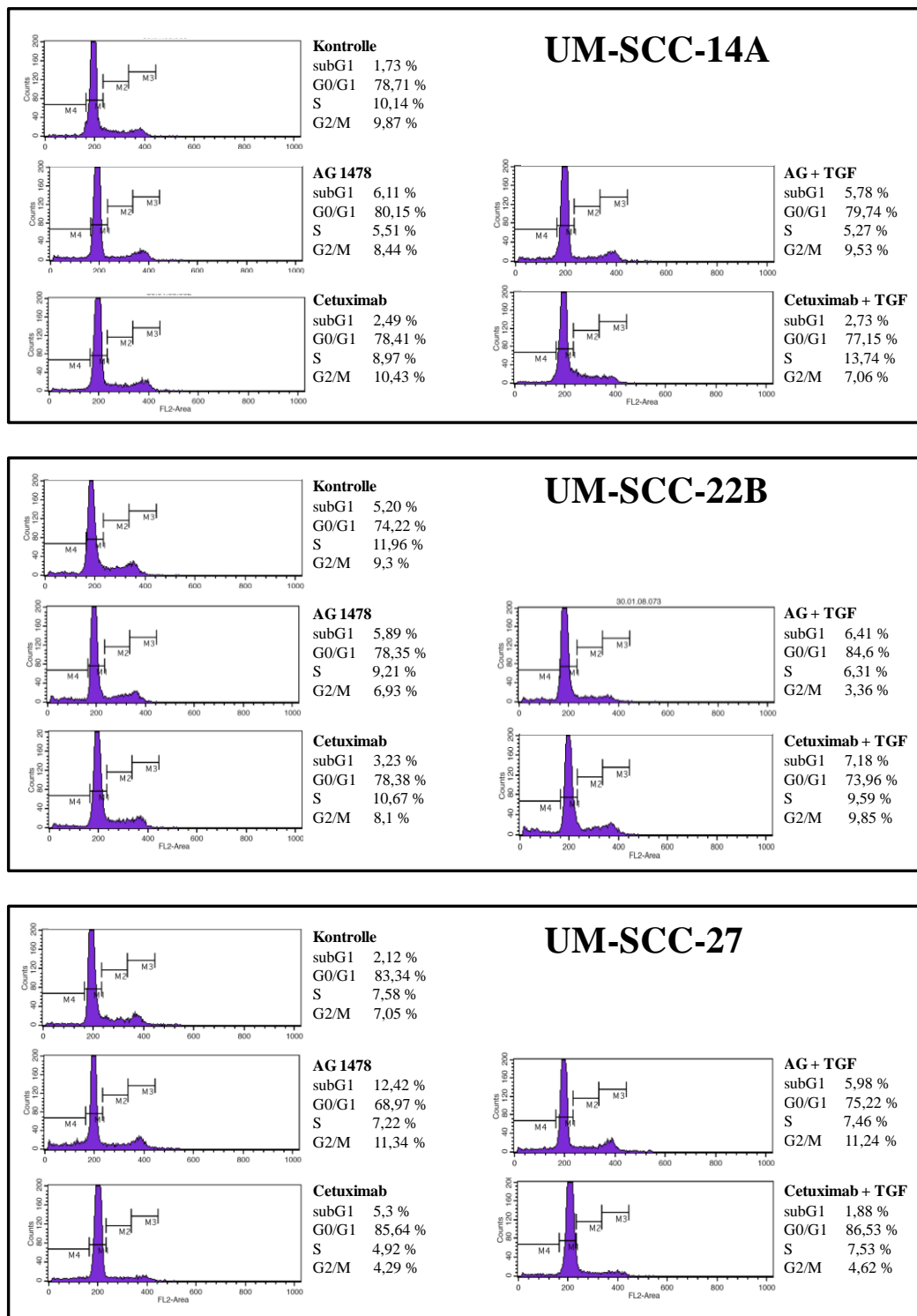


Abbildung 8.2 Histogramme der FACS-Analyse der elf Zelllinien in unbehandeltem Zustand, unter TGF- α , AG1478, Cetuximab und unter Inhibition bei Liganden-Stimulation.

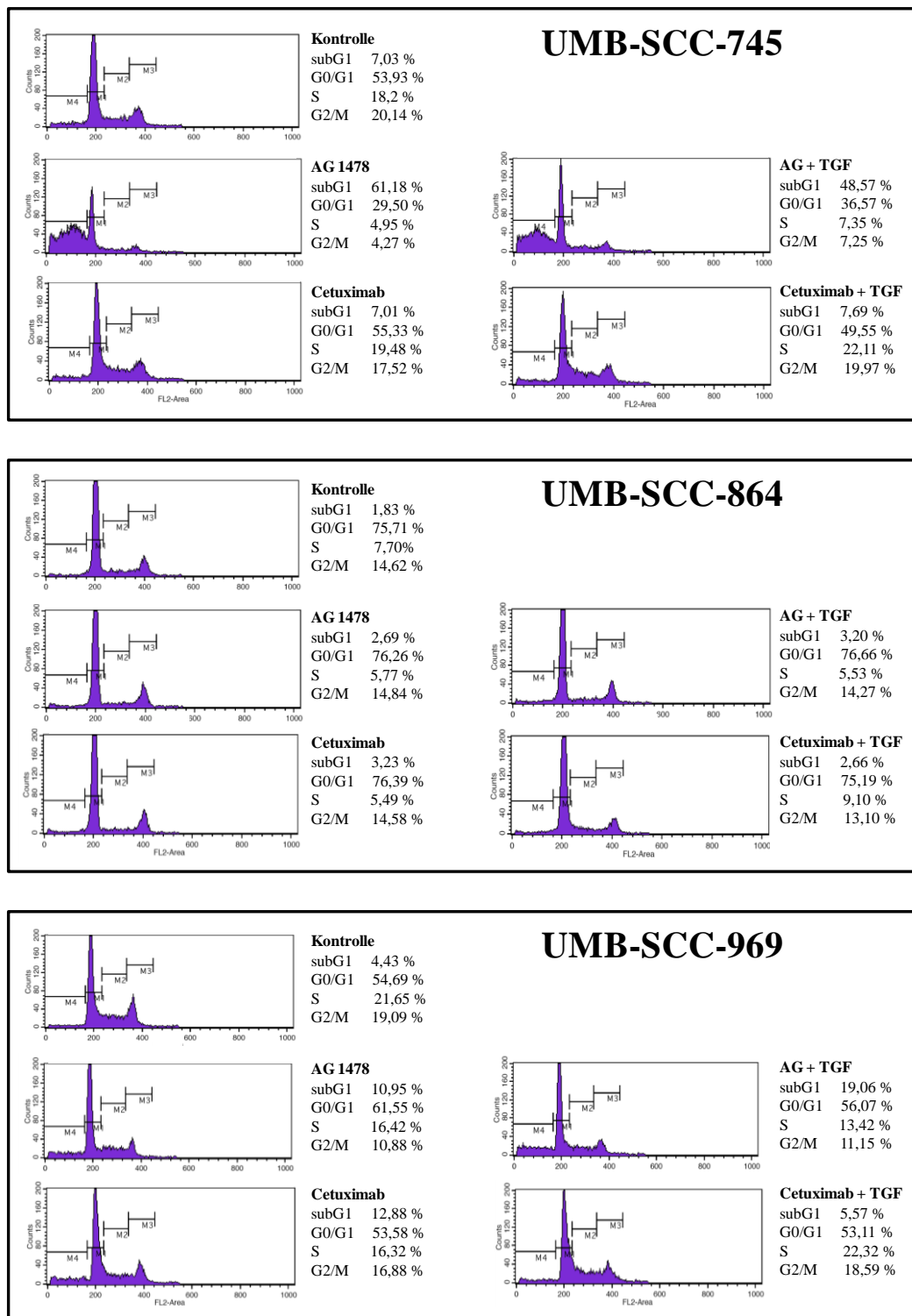


Abbildung 8.3 Histogramme der FACS-Analyse der elf Zelllinien in unbehandeltem Zustand, unter TGF- α , AG1478, Cetuximab und unter Inhibition bei Liganden-Stimulation.

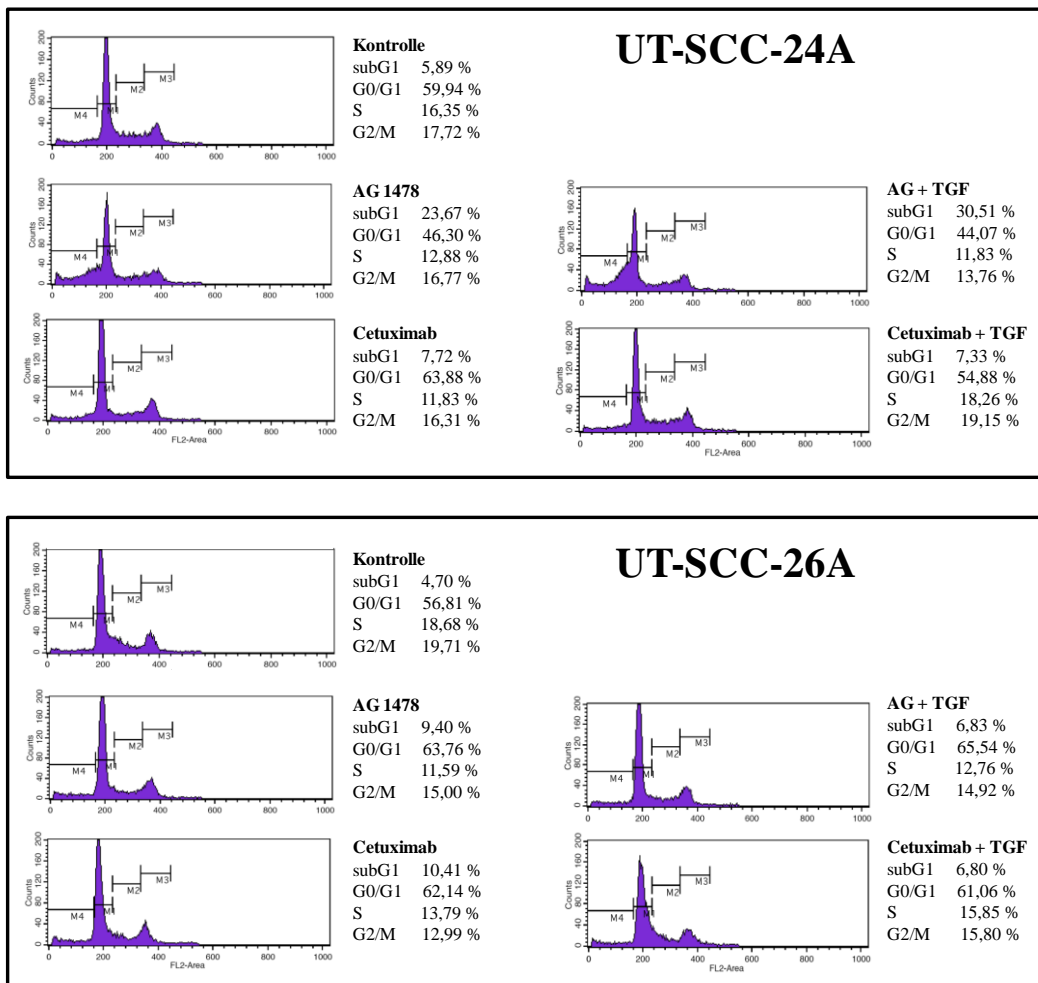


Abbildung 8.4 Histogramme der FACS-Analyse der elf Zelllinien in unbehandeltem Zustand, unter TGF- α , AG1478, Cetuximab und unter Inhibition bei Liganden-Stimulation.

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des EGF-Rezeptor mit seiner Signalvermittlung.	3
Abbildung 3.1 Schematische Darstellung einer PCR.....	21
Abbildung 3.2 PCR Cloning Kit-Vektor mit Insertionsstelle (rot).	24
Abbildung 3.3 Plasmidsequenz im Bereich der Insertionsstelle mit den vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme.	26
Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Messung des TEER.	33
Abbildung 4.1 Vergleich des Einflusses einer TGF- α -Stimulation auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten.....	37
Abbildung 4.2 Western Blot-Analyse von HNSCC-Zelllinien nach Stimulation mit steigenden TGF- α -Konzentrationen.	39
Abbildung 4.3 Vergleich des Einflusses von AG1478 auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten.....	41
Abbildung 4.4 Western Blot-Analyse des Einflusses von AG1478 auf Rezeptoraktivität und EGFR-abhängige Signalvermittlung mit Aktin als Ladungskontrollen.	43
Abbildung 4.5 Vergleich des Einflusses von Cetuximab auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten.....	45
Abbildung 4.6 Western Blot-Analyse des Einflusses von Cetuximab auf Rezeptoraktivität und EGFR-abhängige Signalvermittlung mit Aktin als Ladungskontrollen.....	47
Abbildung 4.7 Vergleich des Einfluss von AG1478 auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten bei gleichzeitiger TGF- α -Stimulation.	49
Abbildung 4.8 Vergleich des Einflusses von Cetuximab auf den Zellzyklus der beiden EGFR-Varianten bei gleichzeitiger TGF- α -Stimulation..	51
Abbildung 4.9 Immunzytochemische Untersuchung der elf Zelllinien auf Änderungen in der subzellulären Lokalisation von EGFR nach TGF- α -Stimulation bei Zelllinien der K497-Variante	54

Abbildung 4.10 <i>Immunzytochemische Untersuchung der elf Zelllinien auf Änderungen in der subzellulären Lokalisation von EGFR nach TGF-α-Stimulation bei Zelllinien der R497-Variante</i>	55
Abbildung 4.11 <i>Immunzytochemische Untersuchung der elf HNSCC-Zelllinien auf autokrine TGF-α-Expression und einem typischen Beispiel einer Kontrolle</i>	57
4.12 <i>Untersuchung zur Auswirkung einer TGF-α-Stimulation auf die Invasivität von HNSCC-Zelllinien</i>	59

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>Verwendete Primärantikörper</i>	14
Tabelle 2 <i>Verwendete 5`Antikörper</i>	15
Tabelle 3 <i>Verwendete 3`Antikörper</i>	15
Tabelle 4 <i>Aufstellung der verwendeten Zelllinien</i>	16
Tabelle 5 <i>Ansatz für Proteinbestimmung nach Bradford</i>	27
Tabelle 6 <i>Verwendete Antikörper</i>	29
Tabelle 7 <i>Versuchsansatz zur immunzytochemischen Untersuchung unter TGFα-Stimulation</i>	31
Tabelle 8 <i>Schematische Darstellung der Vorbehandlung der Zelllinien</i>	32
Tabelle 9 <i>EGFR-Sequenzanalyse in HNSCC-Zelllinien</i>	35

8.5 Publikationen

Mandic R, Rodgarkia-Dara CJ, Krohn V, Wiegand S, Grenman R, Werner JA. Cisplatin resistance of the HNSCC cell line UT-SCC-26A can be overcome by stimulation of the EGF-receptor. Anticancer Research, 2009 Apr.; 29(4):1181-7

8.6 Tabellarischer Lebenslauf

Personalien

Name:	Krohn Vanessa
Geburtsdatum:	26.10.1982
Geburtsort:	Marburg
Nationalität:	Deutsch

Schule

Grundschule:	1989 - 1993:	Marburg
Gymnasium:	1993 - 2002:	Gymnasium Philippinum, Marburg
Abitur:	06/2002	

Medizinische Ausbildung

Studium:	10/2002 - 10/2004:	Georg-August Universität, Göttingen
	10/2004- 10/2005:	Technische Universität, Dresden
	10/2005- 10/2009:	Philipps-Universität, Marburg
Ärztliche Vorprüfung:	09/2004	
Ärztliche Prüfung:	11/2009	Philipps-Universität, Marburg

Medizinische Weiterbildung

Assistenzärztin:	seit 01/2010 Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Uniklinikum Gießen und Marburg Standort Gießen
------------------	---

Marburg, den 18.08.2010

8.7 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen/Herren

in Göttingen: Burkhardt, Krieglstein, Richter, Schulz, Viebahn, Zeek

in Dresden: Heidel, Jacobs, Kugler, Rieger, Ravens

in Marburg:

Arabin

Baum, Baumann, Barth, Basler, Berger, Behr, Bertalanffy, Bette, Bien

Czubayko

Dettmeyer

Eilers, Engenhardt-Cabillic

Fuchs-Winkelmann

Geks, Gerdes, Grzeschik, Gress, Gudermann

Hertl, Hermann-Lingen, Höffken, Hofmann, Hoyer

Kalinowski, Kill, Klose, Krieg, Kroll

Langer, Lohoff

Maisch, Meyer, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters

Neubauer

Oertel

Pagenstecher

Remschmidt, Renz, Richter, Rothmund, Ruchholtz

Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schrader

Vogelmeier

Wagner, Werner, Wulf

8.8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. J. A. Werner danke ich ganz herzlich dafür, diese Doktorarbeit in der HNO-Klinik der Philipps-Universität Marburg ermöglicht zu haben. Ebenfalls danke ich Ihm für seine Unterstützung in Rat und Tat.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Robert Mandic für die interessante Themenstellung dieser Doktorarbeit, die sehr gute Betreuung während der gesamten Zeit, die vielen Ideen und Konzepte. Ich danke Ihm dafür, dass er mich als Leiter des Forschungslabors der HNO Marburg von Anfang an hervorragend unterstützte und für die sowohl fachlichen als auch persönlichen Gespräche, für die er stets Zeit gefunden hat.

Frau R. Peldszus und G. Sadowski danke ich sehr für die freundliche und herzliche Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils dieser Dissertation.

Ich danke Herrn Dr. M. Bette (Institut für Anatomie und Zellbiologie, Philipps-Universität Marburg) für die Möglichkeit der Nutzung des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops und für die freundliche Unterstützung beim Mikroskopieren.

Herrn Dr. W. Meissner (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg) danke ich für die nette Unterstützung bei der Durchführung von PCR-Untersuchungen und FACS-Analysen.

Bei meinen „Mit-Doktoranden“ im Labor, insbesondere bei Frau Carolina Sterz und Frau Fiona Rodepeter, bedanke ich mich ganz herzlich für die nette Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt allen Angestellten der HNO, besonders Frau Dr. S. Wiegand für die freundliche Hilfe bei der Bearbeitung der FACS-Analysen.

Ich danke meiner Familie und Johannes, für die großartige Unterstützung im Studium und während der Promotion. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

8.9 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „*Sequenzanalyse des Epidermal Growth Factor Recptors bei Plattenepithel-Karzinom-Zelllinien des Kopf-Hals-Bereichs und ihre potentielle Bedeutung für die Pathogenese*“ in der Klinik für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde unter der Leitung von Prof. Dr. J. A. Werner mit Unterstützung durch PD Dr. R. Mandic ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vanessa Krohn

Marburg, den 18.08.2010